

**VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE**  
**Fakulta potravinářské a biochemické technologie**  
Ústav mléka, tuků a kosmetiky

**Habilitační práce**

**DEGRADACE TRIACYLGLYCEROLŮ, FYTOSTEROLŮ  
A TOKOFEROLŮ PŘI RAFINACI A CHEMICKÉ MODIFIKACI  
ROSTLINNÝCH OLEJŮ A TUKŮ**

Autor: Ing. Jan Kyselka, Ph.D.

Habilitační obor: Technologie potravin

Praha 2021

**UNIVERSITY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
PRAGUE**

**Faculty of Food and Biochemical Technology**

Department of Dairy, Fat and Cosmetics

**Habilitation thesis**

**DEGRADATION OF TRIACYGLYCEROLS, PHYTOSTEROLS  
AND TOCOPHEROLS DURING REFINING AND CHEMICAL  
MODIFICATION OF VEGETABLE FATS AND OILS**

Author: Ing. Jan Kyselka, Ph.D.

Habilitation field: Food Technology

Prague 2021

Tato habilitační práce byla vypracována na Ústavu mléka, tuků a kosmetiky Vysoké školy chemicko-technologické v Praze v období říjen – prosinec 2020.

Prohlašuji, že jsem habilitační práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním habilitační práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze, dne 11. ledna 2021

.....

Děkuji prof. Ing. Vladimíru Filipovi, CSc., prof. Ing. Janu Šmidrkalovi, CSc., Ing. Ivetě Hrádkové, Ph.D., Ing. Markétě Berčíkové, Ph.D., Ing. Eriku Peškovi a Věře Polákové za trpělivost, cenné odborné rady a podporu při hledání vlastní akademické cesty včetně slepých uliček. Dále bych rád poděkoval všem kolegům a absolventům za vytvoření výjimečného, téměř rodinného prostředí. Zvláštní poděkování patří mým nejbližším, především přítelkyni Janě, dětem Natálce a Vojtíškovi, rodičům, příbuzným a přátelům, bez jejich podpory a důvěry bych to nezvládl. Tuto práci bych rád věnoval mamince Miroslavě, kterou nám předčasně vzala pandemie.

# OBSAH

Prohlášení

Poděkování

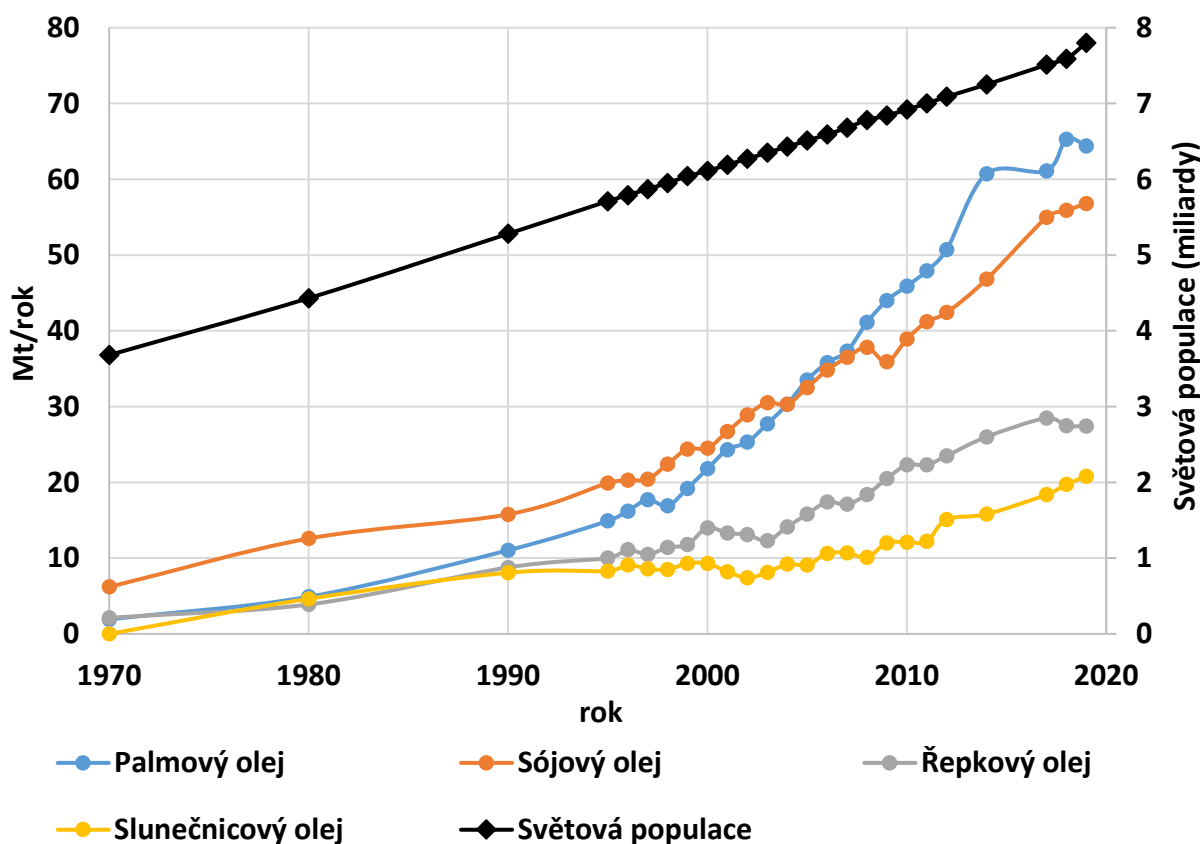
|      |                                                                                                                |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.   | ÚVOD .....                                                                                                     | 1  |
| 2.   | AKTUÁLNÍ PRODUKCE OLEJŮ A TECHNOLOGICKÝ VÝVOJ .....                                                            | 2  |
| 2.1. | Mechanismus degradace alkylhydroperoxidů při rafinaci olejů a tuků.....                                        | 5  |
| 2.2. | Termické radikálové a pericyklické reakce nenasycených lipidů při praktické absenci kyslíku.....               | 12 |
| 2.3. | Vliv rafinace a chemické modifikace na obsah esterů 3-MCPD a glycidolu...                                      | 20 |
| 2.4. | Degradace tokoferolů při deodoraci a fyzikální rafinaci olejů a tuků.....                                      | 26 |
| 2.5. | Vliv rafinace a chemické modifikace na obsah volných, vázaných fytosterolů a jejich degradačních produktů..... | 34 |
| 3.   | BUDOUCNOST RAFINACE A MODIFIKACE ROSTLINNÝCH OLEJŮ.....                                                        | 41 |
| 4.   | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....                                                                                | 46 |
| 5.   | PŘÍLOHY.....                                                                                                   | 47 |

## 1. ÚVOD

Na prahu 21. století se stali nositeli technologického pokroku v oblasti rafinace a modifikace rostlinných olejů a tuků přední světoví výrobci strojních zařízení (Desmet Ballestra, Alfa Laval, GEA, HF Press+LipidTech, Olexa, French), (nano)reaktorů (Cavitation Technology Inc., Arisdyne, BUSS ChemTech), adsorbentů (Clariant, Mineral Technologies Inc., Sepiolsa Minerva Group, Oil-Dri Fluids Purification), hydrogenačních katalyzátorů (BASF Catalysts, Johnson Matthey, Evonik) a v neposlední řadě imobilizovaných enzymů (Novozymes) pro průmyslové aplikace. Aktuální vývoj je motivován strmě rostoucí, zdánlivě udržitelnou produkcí olejin, požadavky spotřebitelů a přísnými nároky na bezpečnost potravin. V roce 2006 a 2009 byly objeveny nové procesní kontaminanty, estery 3-monochlorpropan-1,2-diolu a glycidolu, současně bylo přijato nařízení Food and Drug Administration (FDA) 68 FR 41434 o povinném značení *trans*-mastných kyselin s účinností od 1. 1. 2006. Provozy neschopné adaptace byly a budou uzavírány. Tyto změny způsobily, že se opětovně prohloubila spolupráce mezi průmyslovou a akademickou sférou. Tam, kde končí analytická koncovka na moderních instrumentálních přístrojích, začíná aplikovaný výzkum zaměřený na nová strojní zařízení a inovativní technologické postupy. Úspěšné odstranění nežádoucích procesních kontaminantů z olejů a tuků se neobejde bez znalosti reakčního mechanismu jejich vzniku, simulace experimentů v poloprovozním měřítku a také organické syntézy komerčně nedostupných standardů. Pouze takový přístup lze označit za seriózní řešení provozně-inženýrských problémů a vede k optimalizaci technologie výroby.

## 2. AKTUÁLNÍ PRODUKCE OLEJŮ A TECHNOLOGICKÝ VÝVOJ

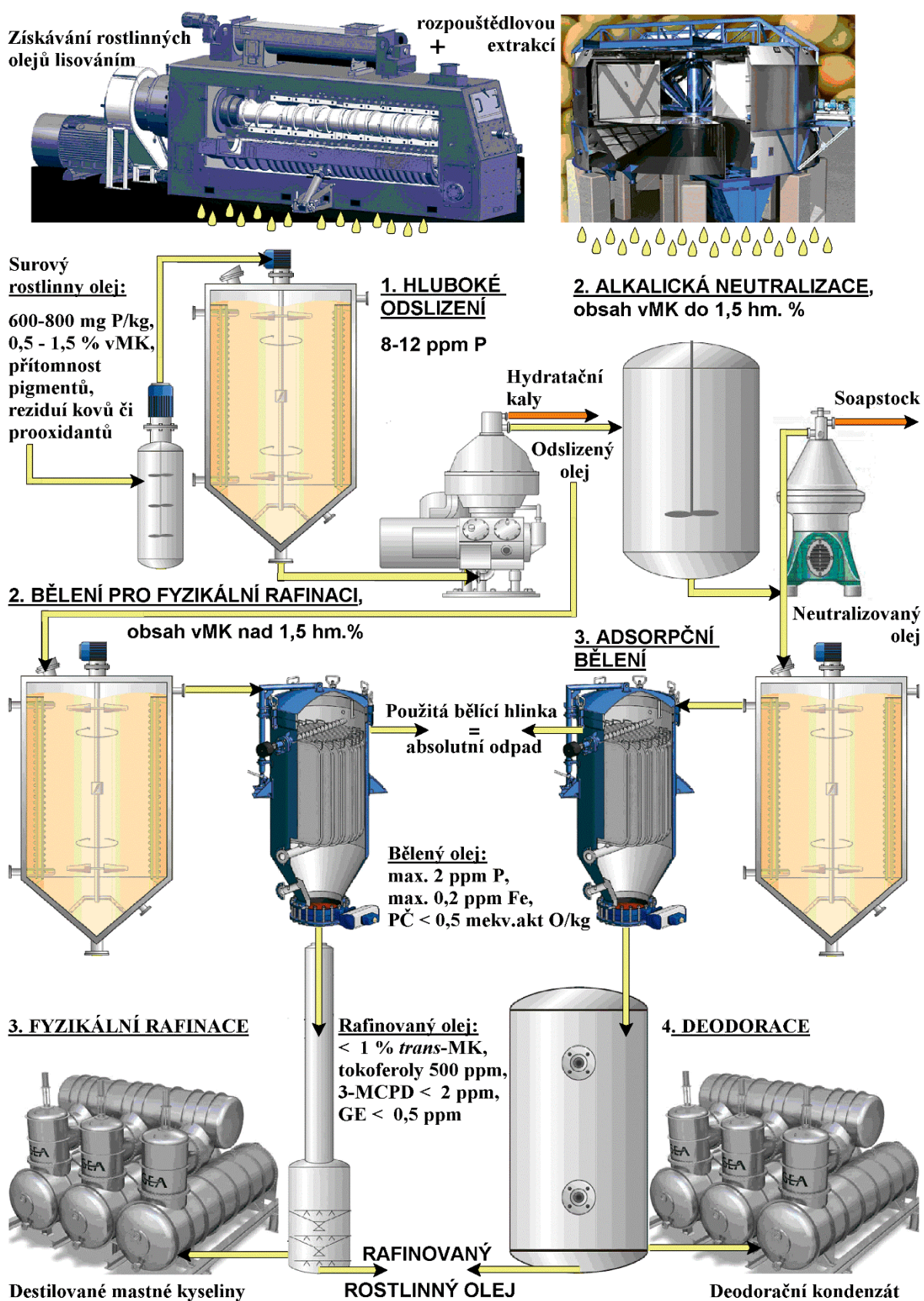
Celosvětová produkce olejů a tuků rostlinného původu dosáhla v roce 2019 výše 210 milionů tun, mezi nejvýznamější komodity řadíme palmový (64,4 Mt), sójový (56,8 Mt), řepkový (27,4 Mt) a slunečnicový (20,8 Mt) olej. Světová produkce olejů trvale roste, v první polovině 20. století byla spotřeba úměrná vývoji světové populace, od r. 1995 však přichází strmý nárůst, který neodpovídá lineárně závislé populační křivce (obr. 1). Hlavní příčinou bylo rozšíření osevních ploch, vyšší výtěžnost surových olejů v případě sóji luštěnaté (*Glycine max*, 0,59 t/ha), řepky olejky (*Brassica napus* subsp. *napus*, 0,78 t/ha) i palmy olejné (*Elaeis guineensis*, 3,08 t/ha) a také masivní využití rafinovaných olejů pro technické účely, zejména pro výrobu biopaliv. Při srovnání spotřeby olejů a tuků v nejvyspělejších a nejlidnatějších regionech zjistíme, že v USA či EU-27 je průměrná spotřeba přibližně 60 kg na osobu/rok, zatímco v Indii činí pouze třetinu, většina produkce včetně importu se tudíž uplatní v potravinářském a krmivářském sektoru<sup>1,2</sup>.



**Obr. 1** Vývoj světové produkce nejvýznamějších rostlinných olejů současnosti a nárůst světové populace od roku 1970.

Surové rostlinné oleje se získávají ze semen (bobů) přímou extrakcí technickým hexanem, dvoustupňovým lisováním nebo kombinací tzv. předlisu s extrakcí dle olejnatosti vstupního materiálu. Získávání oleje předchází úprava semen vložkováním a kondicionací. Kombinovaný účinek tlaku, tahu, střížných sil a syté vodní páry vytváří vločky s narušenými buněčnými stěnami prostoupené systémem kapilár ( $r \approx 8 - 25 \mu\text{m}$ ), makro- a mesopórů a také větším měrným povrchem ( $S_{\text{BET}} \approx 1,3 - 1,5 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$ )<sup>3,4</sup>. Zjistili jsme, že rychlost perkolační extrakce je ovlivněná především velikostí a geometrií výlisků. Počáteční strmou část extrakční křivky popisuje modifikovaná Hagen-Poiseuilleova rovnice pro laminární tok Newtonské kapaliny, tedy miscely, zatímco rychlost závěrečné fáze rozpouštědlové extrakce ovlivňují difuzní pochody ( $D = 1 - 8 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) přes intaktní buněčné stěny ve výliscích<sup>4</sup>. Lipidomická analýza reziduálního oleje prokázala přítomnost vosků, glycerofosfolipidů a glyceroglykolipidů s esterově vázanou kyselinou (Z)-oktadec-11-enovou (asklepiovou). Jednalo se o nové indikátory efektivně provedeného procesu rozpouštědlové extrakce<sup>3</sup>.

Nevyhovující barva, nízká oxidační stabilita, obsah nežádoucích sloučenin včetně senzoricky nežádoucích látek a kontaminantů z prvovýroby činí surové oleje obtížně obchodovatelné. Šetrná rafinace rostlinných olejů a tuků je logickým řešením. Výsledkem technologického vývoje jsou dvě základní uspořádání a to rafinace s uplatněním chemického stupně a tzv. fyzikální rafinace<sup>5,6</sup>. Zásadním rozdílem je způsob technologického odstranění volných mastných kyselin (vMK). Chemická rafinace je založena na alkalické neutralizaci vMK a odstředění mýdlových kalů (soapstocků) samoodkalovacími talířovými odstředivkami. Při fyzikální rafinaci jsou vMK odstraněny destilací s přehřátou vodní parou v technologii deodorace-deacidifikace (220 – 260 °C, 2 – 5 hPa, 1 – 3 h). Oba rafinační postupy mají značné uplatnění (obr. 2) a volba procesu závisí zejména na kvalitě a složení surového rostlinného oleje (obsah vMK, lipofilních pigmentů a polynenasycených mastných kyselin) a také celkové ekonomice rafinačního postupu<sup>5-7</sup>. Současný technologický výzkum rozvíjí obě rafinační metody, v technologii chemické rafinace je vysoce inovativní aplikace hydrodynamických kavitačních (nano)reaktorů. Pokrokem v technologii fyzikální rafinace je efektivnější odkyselování. Zásadní změnou je konstrukce destilačních kolon s pre-stripovací sekcí na místo parních ejektorů s barometrickou kondenzací. Inovativní je rovněž zavedení účinného vakuového systému ve spojení s vymrazovacími systémy, které mohou významně snížit spotřebu páry ( $< 15 \text{ kg/tunu oleje}$ ), elektrické energie i chladicí vody. Pro výrobce odkyselovací jednotky je klíčové dosažení hlubokého a stabilního vakua (1 – 2 hPa), což podstatně sníží dobu zdržení oleje v aparatuře.



**Obr. 2** Schéma chemické a fyzikální rafinace rostlinných olejů a tuků s odlišným způsobem odstranění volných mastných kyselin.

## 2.1. Mechanismus degradace alkylhydroperoxidů při rafinaci olejů a tuků

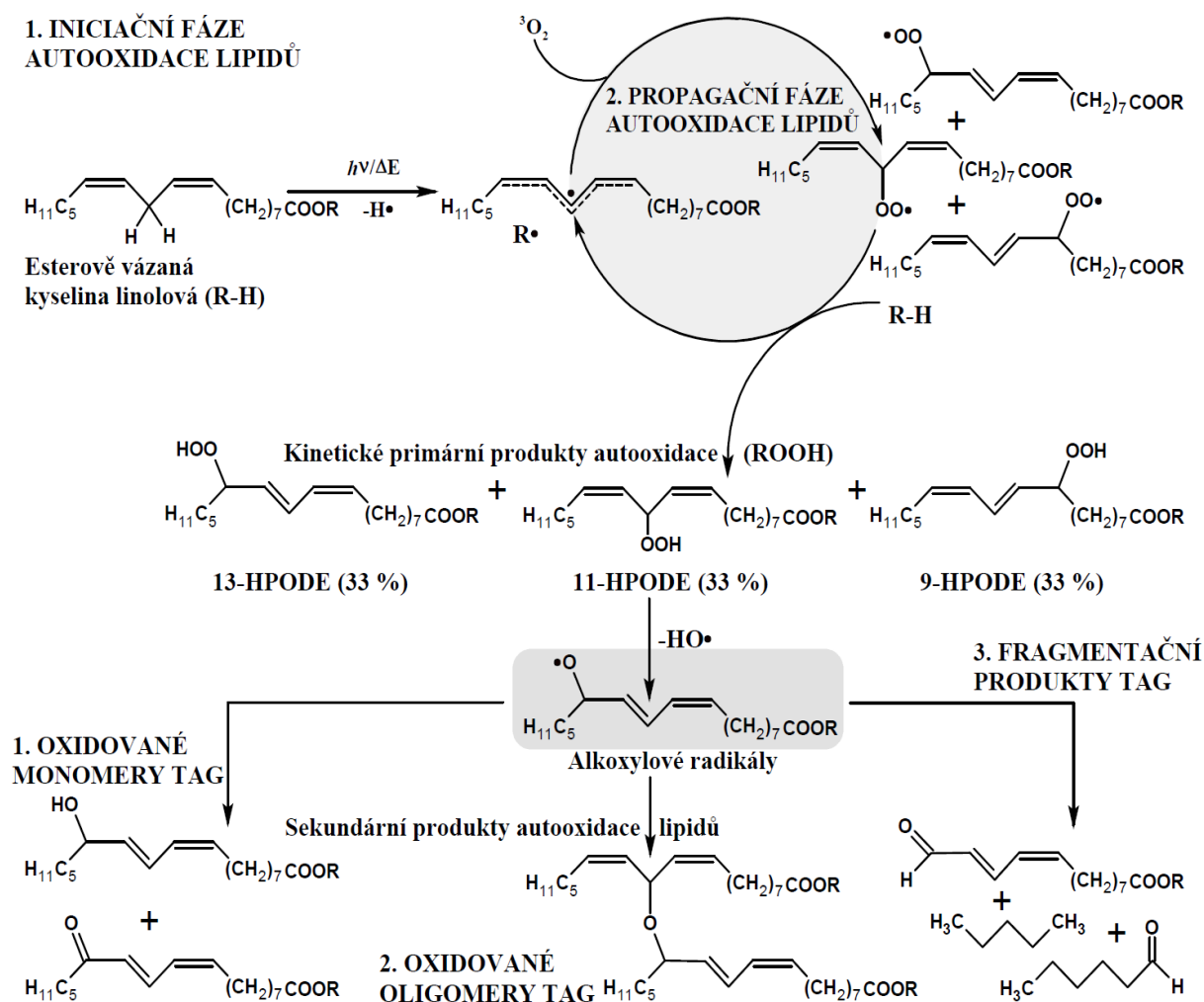
Autooxidace je pravděpodobně nejdůležitější reakcí lipidů, která se uplatňuje při zpracování i skladování potravin. Při fyzikálním či chemickém způsobu rafinace rostlinných olejů lze minimalizovat autooxidační změny snížením parciálního tlaku kyslíku, zkrácením doby zdržení při vysokoteplotním namáhání a aplikací ochranné inertní atmosféry. I přesto se jedná o fenomén, který definuje datum spotřeby finálních výrobků a řada oxidovaných lipidů (*n*-oxokyseliny, oxidované oligomery mastných kyselin, tokoferochinony etc.) v plně rafinovaných olejích definitivně zůstává.

Autooxidace volných nebo esterově vázaných mastných kyselin je radikálovou řetězovou reakcí, která je zahájena homolytickým štěpením vazby C-H v iniciační fázi. K rozštěpení kovalentní vazby je nutné dodat disociační energii (BDE, bond dissociation energy), iniciace může být způsobena tepelným záhřevem, UV zářením nebo reakcí s železitými ionty. Vodík se nejsnáze odštěpí z methylenové skupiny v *bis*-allylové poloze (BDE = 327 - 335 kJ/mol) polynenasycených mastných kyselin, propagační fáze peroxidace nenasycených lipidů je samovolná (exergonická)<sup>8,9</sup>. Reakce tripletového kyslíku s *bis*-allylovým radikálem kyseliny linolové je v souladu s Wignerovým pravidlem o zachování spinu. Základní transformací propagačního stupně je tvorba primárních oxidačních produktů – alkylhydroperoxidů. Tím se propagují až tisíce dalších cyklů (obr. 3). V přítomnosti dobrého donoru vodíku, například  $\alpha$ -tokoferolu, jsou kinetickými produkty autooxidace kyseliny linolové tyto sloučeniny: (10*E*,12*Z*)-9-hydroperoxyoktadeka-10,12-dienová (9-HPODE, 33 %), (9*Z*,12*Z*)-11-hydroperoxyoktadeka-9,12-dienová (11-HPODE, 33 %) a (9*Z*,11*E*)-13-hydroperoxyoktadeka-9,11-dienová (13-HPODE, 33 %)<sup>8,9</sup>.

Po dosažení tzv. indukční periody byly v rostlinném oleji kvantitativně spotřebovány primární antioxidanty, absence dobrých donorů vodíku mění zastoupení primárních oxidačních produktů a reakce je nyní řízena termodynamicky. Nově vzniká k. (10*E*,12*Z*)-9-hydroperoxyoktadeka-10,12-dienová (10 %), (10*E*,12*E*)-9-hydroperoxyoktadeka-10,12-dienová (40 %), (9*Z*,11*E*)-13-hydroperoxyoktadeka-9,11-dienová (10 %) a (9*E*,11*E*)-13-hydroperoxyoktadeka-9,11-dienová (40 %), zcela chybí produkty se systémem izolovaných dvojných vazeb (11-HPODE)<sup>8</sup>. Z praktického hlediska je zásadní popis tvorby kinetických produktů, protože ilustruje oxidační změny čerstvých olejů.

V provozních podmínkách se zpracovatelé olejin spoléhají na rutinní stanovení peroxidového čísla, přičemž v souladu s dobrou výrobní praxí jsou alkylhydroperoxydy v průběhu rafinace zcela rozloženy ( $P\check{C} \leq 0,5$  mekv.akt. O/kg). Klíčový je mechanismus degradace alkylhydroperoxidů (ROOH) a charakterizace sekundárních oxidačních produktů

mastných kyselin, neboť hrají důležitou úlohu v patogenezi řady onemocnění (rakovina, atherogeneze, rozedma plic). Produkty následných reakcí ROOH doprovází rovněž methyl estery mastných kyselin v biodieselu 2. generace a pravděpodobně jsou skupinou rozhodujících markerů pro správné celní zařazení. Destruktivní následné reakce RO-OH zahrnují alkoxylové radikály ( $BDE = 197 \text{ kJ/mol}$ ), přičemž standardní redukční potenciály poloreakcí umožňují predikovat směr i termodynamickou uskutečnitelnost reakcí (Tab. I)<sup>10-12</sup>.



**Obr. 3** Tvorba primárních produktů autooxidace mastných kyselin – alkylhydroperoxidů a vybraných produkty jejich následných přeměn.

Reaktivní alkoxylové radikály ( $E^\theta = 1,60 \text{ V}$ ) lipidů oxidují sloučeniny umístěné v elektrochemické řadě níže, typickým příkladem je homolytické štěpení C-H vazby v bis-allylové ( $E^\theta = 0,60 \text{ V}$ ) poloze kyseliny linolové při propagační fázi autooxidace. Oxidačně-redukční reakce je samovolná (exergonická), pokud je změna Gibbsovy energie  $\Delta_r G^\theta < 0$  (konstantní T a p) a současně platí, že hodnota standardního napětí článku  $E^\theta_{\text{cell}} > 0$ . Je nutno

vzít v úvahu, že reakce, jež jsou termodynamicky možné, nemusí být kineticky pravděpodobné, neboť rychlostní konstanta reakce je příliš nízká<sup>10,13</sup>.

Tabulka I Standardní napětí článku  $E^\ominus_{\text{cell}}$  (298 K, 101,325 kPa) jako kvantitativní měřítko termodynamické uskutečnitelnosti dílčích autooxidačních redoxních reakcí [upraveno dle Buettner, 1993; Koppenol, 1990]

| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ] |                   |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| -                                | -                                | -                                                                              | -                 |
| -                                | -                                | 60                                                                             | -                 |
| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ] |                   |
| -                                | -83,68                           | 1·10 <sup>9</sup>                                                              | 3·10 <sup>8</sup> |
| 0,4                              | -38,59                           | 1 až 100                                                                       | 10 až 40          |
| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ] |                   |
| 0,21 až<br>0,22                  | -20,26 až<br>-21,23              | -                                                                              | -                 |
| 0,55 až<br>0,60                  | -53,07 až<br>-57,89              | -                                                                              | -                 |
| 0,95 až<br>1,00                  | -91,66 až<br>-96,49              | 9·10 <sup>6</sup>                                                              | -                 |
| -                                | -                                | -                                                                              | -                 |
| 1,3                              | -125,43                          | -                                                                              | -                 |
| 0,87                             | -84,00                           | -                                                                              | 3·10 <sup>9</sup> |
| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ] |                   |
| -                                | -                                | 1·10 <sup>6</sup> až<br>1·10 <sup>8</sup>                                      | -                 |

INICIACE:

a)  $\text{In-In} \longrightarrow \text{In}\cdot + \text{In}\cdot$

b)  $\text{In}\cdot + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2 \xrightarrow{k_i \text{ LH}} \text{In-H} + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\cdot$

PROPAGACE:

c)  $\text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\cdot + \cdot\text{O-O}\cdot \xrightarrow{k_{\text{PEROX}}} \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot$

d)  $\text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2 \xrightarrow{k_p} \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OOH} + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\cdot$

NÁSLEDNÉ (SEKUNDÁRNÍ) REAKCE ALKYLHYDROPEROXIDŮ (ROOH):

e)  $\text{vodný roztok nebo citrátový komplex Fe (II)} + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OOH} \xrightarrow{-\text{OH}} \text{vodný roztok nebo citrátový komplex Fe (III)} + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot$

f)  $\text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OOH} \longrightarrow \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OOH} + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot$

g)  $\text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2 \longrightarrow \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OOH} + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\cdot$

h)  $\text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{OO}\cdot \xrightarrow[\text{(\beta-scission)}]{\text{fragmentace}} \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\text{O} + \text{H}_3\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot$

ch)  $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2 \longrightarrow \text{H}_3\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{R}_1\text{CH=CH-CH=CH-R}_2\cdot$

i)  $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot + \cdot\text{O-O}\cdot \longrightarrow \text{H}_3\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OO}\cdot$

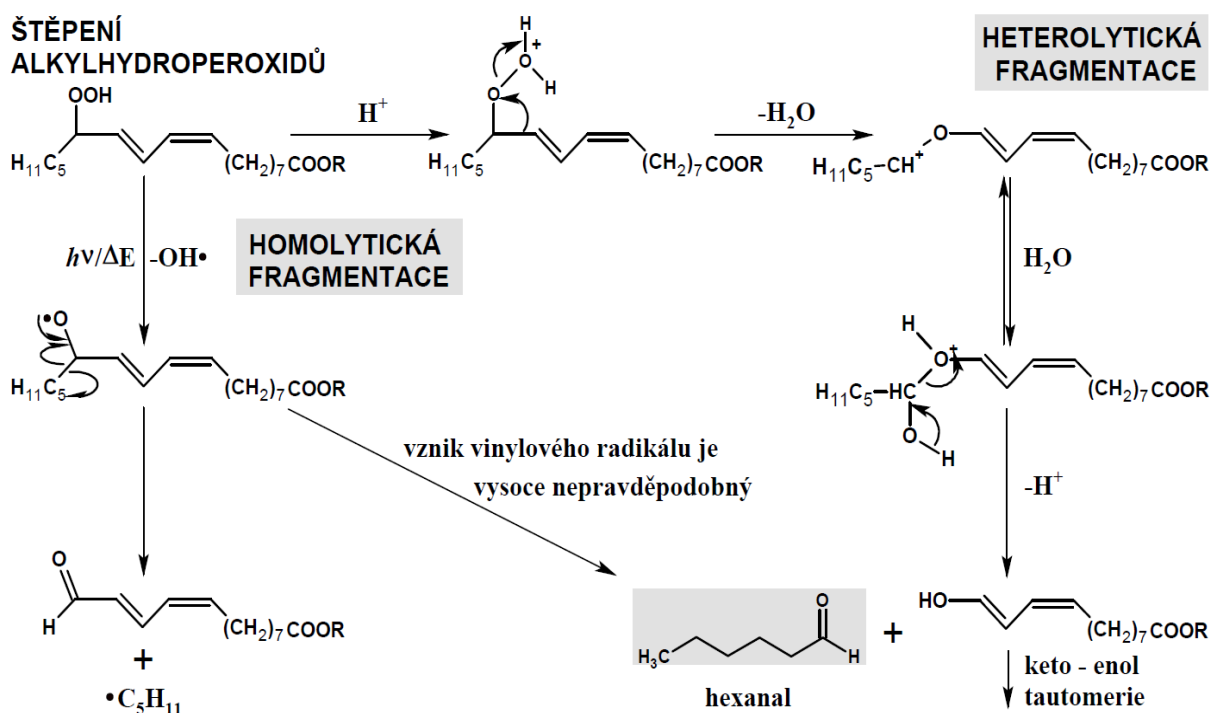
TERMINACE:

k)  $2 \text{ROO}\cdot \xrightarrow{\text{vysoký } p_{\text{O}_2}} \text{ROOOOR} \longrightarrow \text{stabilní produkty} + {}^1\text{O}_2$   
 $2 \text{R}\cdot \xrightarrow{\text{nizký } p_{\text{O}_2}} \text{RR}$

Hodnoty  $\Delta_r G^\ominus$  reakcí pentadienylového systému s alkoxylovými nebo peroxylovými radikály poskytují kvantitativní podklad empirickým zjištěním, které jsou shrnuty v tabulce I. Reakce *c*, *d* představují základ propagačního řetězce autooxidace lipidů. Celková změna Gibbsovy energie v propagační fázi je -122,27 kJ/mol (= -83,68 kJ/mol + (-38,59 kJ/mol)). Redoxní reakce je samovolná a může propagovat další cykly radikálové tvorby<sup>10,13</sup>. Podobně

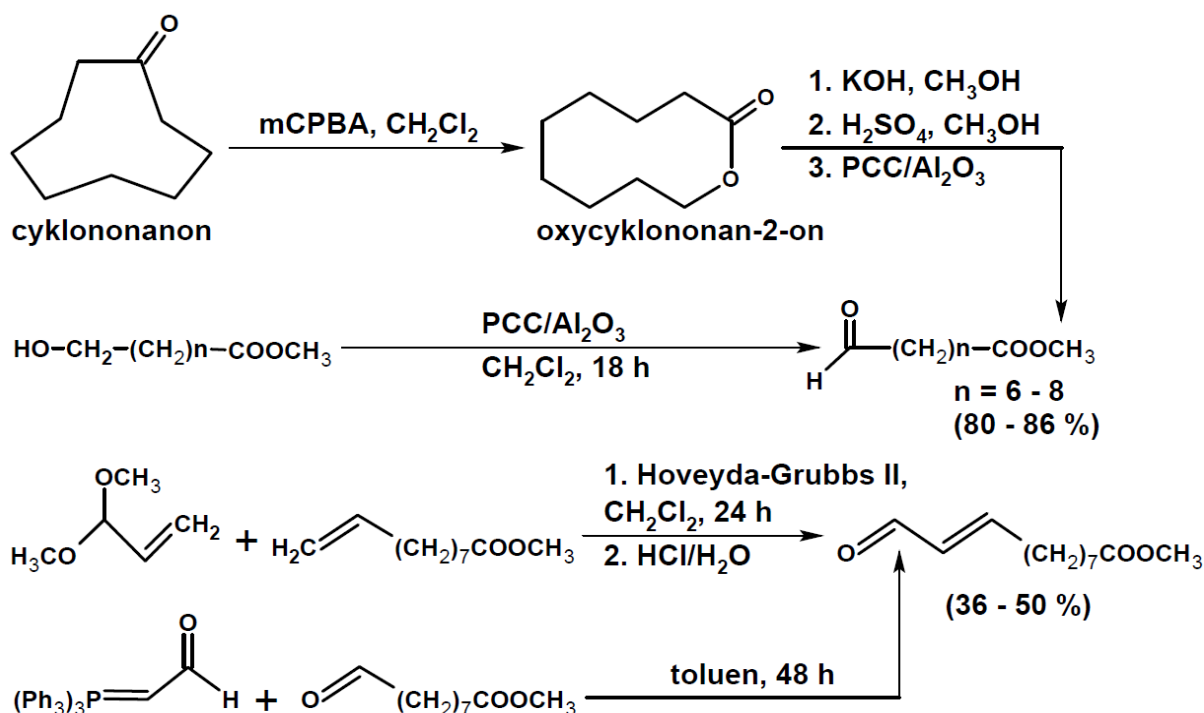
je tomu i v případě následných reakcí alkylhydroperoxidů (reakce *e* až *i*). Z tabulky I plyne, že všechny reakce jsou termodynamicky možné. Rozhodující vliv na rychlost autooxidace a vznik konečných produktů následných (sekundárních) reakcí je nejpomalejší, respektive řídící děj. Ze sledu elementárních reakcí se jedná o homolytické štěpení vazby C-H v *bis*-allylové poloze (reakce *b*, *d*).

Alkoxylové radikály (RO•) mastných kyselin mohou poskytovat v následných reakcích tři skupiny sekundárních oxidačních produktů - oxidované monomery (reakce *f*, *g* v tab. I), oxidované oligomery (reakce *k*) a fragmentační produkty (reakce *h* až *i*). Otazníkem zůstává osud hydroxylových (HO•) radikálů. Za klíčové reakční produkty lze považovat třetí skupinu sloučenin s nižší molekulovou hmotností, protože ovlivňují senzorické vlastnosti a jsou nositeli typické žluklé chuti i vůně s nízkým podnětovým prahem (alkanaly  $\approx 10^{-2}$  -  $10^0$  mg/kg; (*E*)-alk-2-enaly  $\approx 10^{-2}$  -  $10^0$  mg/kg; (*E,E*)-alka-2,4-dienaly  $\approx 10^{-2}$  -  $10^{-1}$  mg/kg)<sup>14</sup>. V chemii potravin dominuje představa, že fragmentační mechanismus ROOH je založen na homolytickém štěpení vazeb, proces je zdrojem dalších radikálů a stimuluje propagační či terminanční fázi autooxidace. Jedná se o zjednodušený pohled, neboť většina potravin je kyselé (pH 4 až 6) a  $pK_a$  hodnoty organických kyselin včetně volných mastných kyselin jsou teplotně závislé. Naše experimentální výsledky potvrdily existenci smíšeného homolyticko-heterolytického mechanismu fragmentace alkylhydroperoxidů při adsorpčním bělení (90 - 110 °C, 40 min, inertní atmosféra) a deodoraci (200 - 240 °C, 2 h, 2 hPa)<sup>15,16</sup>. Kysele katalyzované štěpení ROOH je analogií výroby fenolu kumenovým způsobem, tedy tzv. Hockovou fragmentací a je uspokojivým vysvětlením vzniku hexanalů (obr. 4), ostatních alkanalů či (*E*)-4-hydroxynon-2-enalu v aprotickém prostředí. Výsledkem homolytického procesu by byla tvorba termodynamicky nejméně stabilních vinylových radikálů (BDE = 460 kJ/mol), což je vysoce nepravděpodobné. Volné mastné kyseliny (0,1 hm. %) a bělicí hlinka, montmorillonit, aktivovaný pomocí HCl či H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> slouží jako H<sup>+</sup> katalyzátory, reakční voda pochází z adsorbentu, případně z rostlinného oleje s typickým obsahem vlhkosti  $\approx 100$  mg/kg, přičemž molárně se jedná o identické množství. Jakým způsobem ovlivňuje reakční kinetiku délka/stabilita alkylového radikálu a konjugace vznikajícího karbonylu je obtížné dohledat v literatuře, stejně jako údaje o homolytickém štěpení kinetického produktu 11-HPODE. Heterolytický způsob fragmentace je přijatelným vysvětlením řady technologických problémů, např. rychlého oxidačního žluknutí polydisperzních systémů s nízkou hodnotou pH (majonézy, dresinky, mléčné či kosmetické výrobky), které mohou být navzdory nízkému peroxidovému číslu senzoricky nepříjemné.



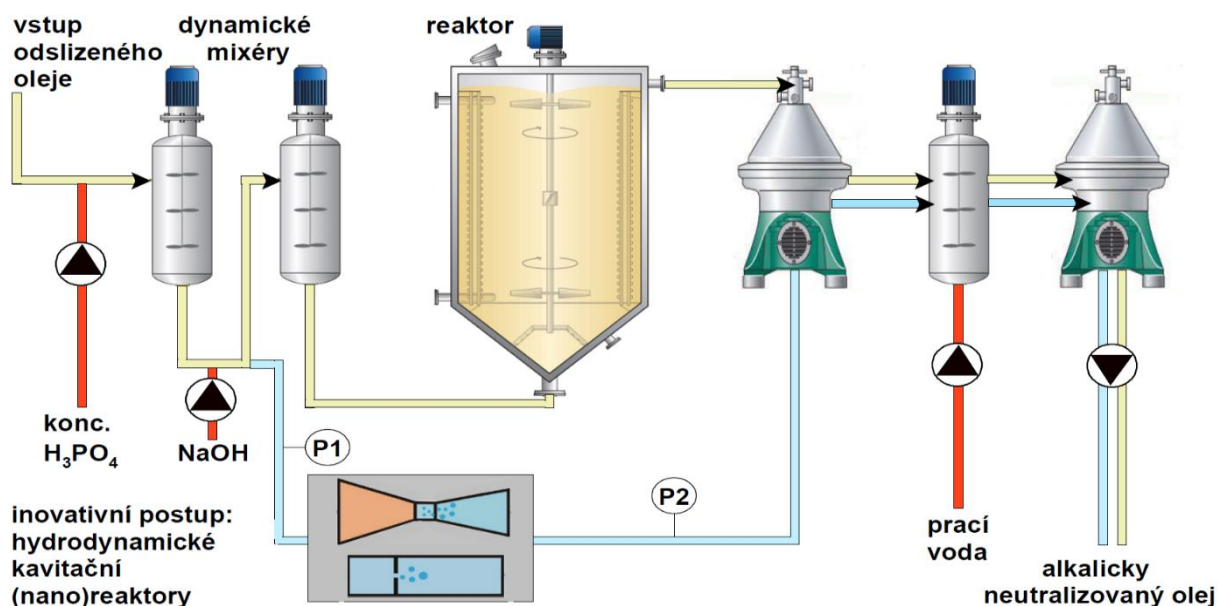
**Obr. 4** Smíšený homolyticko-heterolytický mechanismus fragmentace alkylhydroperoxidů při adsorpčním bělení a deodoraci/odkyselování rostlinných olejů.

Z technologického hlediska nepředstavují uvolněné těkavé C6 – C9 alkanaly, (*E*)-alk-2-enaly a (*E,E*)-alka-2,4-dienaly problém, neboť jsou kvantitativně odstraněny (< 1 µg/kg) v procesu deodorace či fyzikální rafinace za vakua s přehřátou vodní parou<sup>3,4</sup>. Rizikové jsou především nasycené a α,β-nenasycené *n*-oxokyseliny („core“ aldehydy) vázané esterovou vazbou na původní acylglyceroly (obr. 4). Společně s ostatními lipidy z potravy podléhají hydrolytickému štěpení pankreatickou lipázou ve dvanáctníku, následuje vstřebávání uvolněných lipidů a rozvod do jater či periferních tkání. Hlavní riziko spočívá v reaktivitě elektrofilních α,β-nenasycených karbonylových sloučenin (akceptory) s nukleofilními donory (proteiny, DNA, glycerofosfolipidy), kromě produktů konjugované adice vznikají rovněž Schiffovy báze<sup>9,17</sup>. Rutinní analýza *n*-oxokyselin nebyla validována a spektrofotometrické stanovení thiobarbiturového či *p*-anisidinového čísla není specifické a neposkytuje informaci o skutečné koncentraci karbonylových sloučenin. Z výše uvedeného plyne zřejmá potřeba pro syntézu nedostupných „core“ aldehydů a vývoj analytické metody. Vybrané nasycené a α,β-nenasycené *n*-oxokyseliny byly připraveny použitím Baeyerovy-Villigerovy oxidace, Wittigovy reakce či metateze, nejúčinnějším homogenním katalyzátorem při metatezi funkcionalizovaných olefinů byl katalyzátor Hoveyda-Grubbs II. generace (obr. 5)<sup>18,19</sup>.



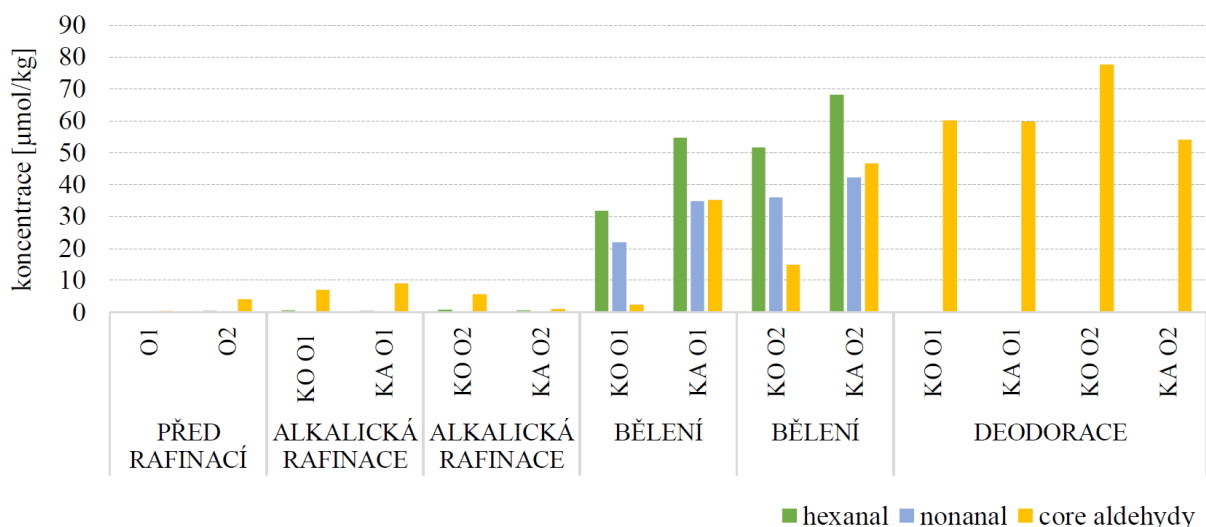
**Obr. 5.** Příprava nasycených a  $\alpha,\beta$ -nenasycených *n*-oxokyselin.

Vznik *n*-oxokyselin reflektuje historii jedlých olejů, společně se stanovením tokoferolů/tokoferochinonů se jedná o jedinečné markery indikující kvalitu suroviny od vstupu do rafinerie až po lahev a také další manipulaci s finálním výrobkem. Podmínky rafinace mají velký vliv na obsah „core“ aldehydů, proto jsme se rozhodli porovnat konvenční alkalickou neutralizaci a inovativní kavitační proces s uplatnění hydrodynamických/ultrazvukových reaktorů (obr. 6)<sup>18-20</sup>. Klasické technologické uspořádání je neměnné 50 let a obvykle se zakládá na postupu Alfa Laval (AL) short mix, dnes jej firma dodává v různých obměnách pod komerčním označením AL long mix, AL combi mix, AL multi mix či AL multi wax. Navržená technologie efektivně odstraňuje nehydratovatelné glycerofosfolipidy, volné mastné kyseliny a také vosky. Za hlavní technologickou nevýhodu lze považovat dobu zdržení vlivem difuze NaOH blankou mýdla, ztráty triacylglycerolů okluzí ve sférických micelách, inkluzí v laminárních mýdlových micelách a také zmýdelňováním TAG. Dynamické mixéry již nemohou vytvořit větší mezifázový povrch, proto byl firmou Cavitation Technologies, Inc. (CTi) vyvinut pokročilý kavitační proces (55 – 65 bar, 15 min, velikost kavitačních bublin 100 nm), který se nazývá „nanoneutralizace“. Firma Desmet Ballestra následně zařadila nanoreaktory jako doplňkovou technologii při alkalické neutralizaci vMK, deklaruje úspory páry na ohřev oleje, kyseliny fosforečné (až 90 %), hydroxidu sodného (40 – 50 %) a také výrazně menší rafinační ztráty (cca 0,2 %).



**Obr. 6** Technologické schéma konvenční a hydrodynamické alkalické neutralizace.

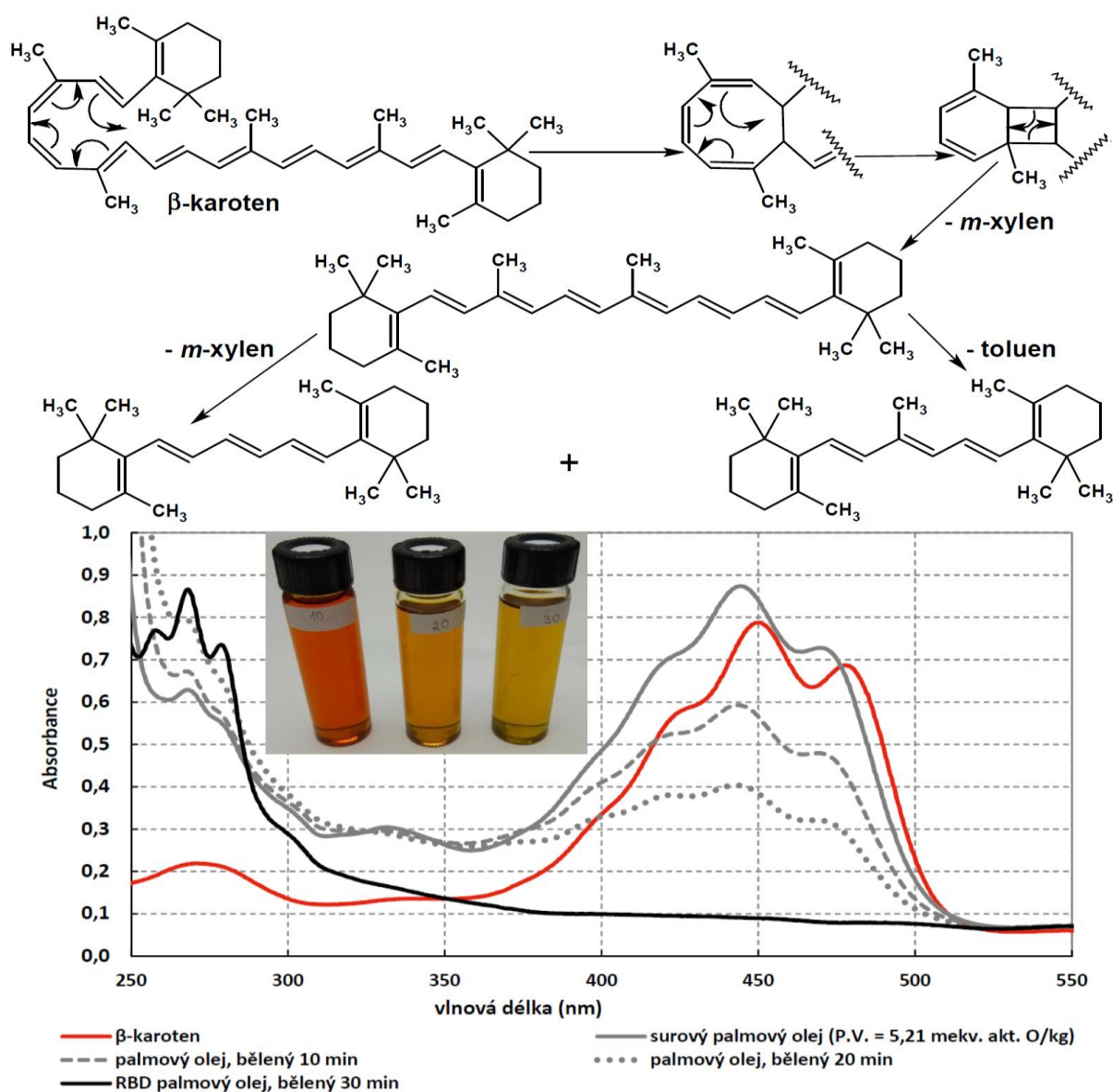
Proces je pokročilou rafinací a kavitační zařízení není pouze účinnějším mixérem, nýbrž (nano)reaktorem, ve kterém jsou v důsledku imploze a prudkého odparu vody rozrušeny reverzní micely nehydratovatelných fosfolipidů, vMK či vznikajících mýdel a reakce již není limitována 1. Fickovým zákonem. Technologie však klade extrémní nároky na vysokotlaká čerpadla a přídatné samoodkalovací odstředivky. Při implozi kavitačních bublin vznikají organické radikály vlivem vysokého lokálního nárůstu teploty a reaktory musí být provozovány striktně v inertní atmosféře argonu či dusíku. Ve spolupráci s TESORO Spin off, s.r.o. a Technoparkem Kralupy jsme podali patentovou přihlášku. Prokázali jsme, že kavitační technologie v ochranné atmosféře nemají nežádoucí vliv na kvalitu rafinovaných olejů<sup>19,20</sup>.



**Obr. 7** Vliv konvenční (KO) a kavitační (KA) technologie na tvorbu karbonylů<sup>19,20</sup>.

## 2.2. Termické radikálové a pericyklické reakce nenasycených lipidů při praktické absenci tripletového kyslíku

Katalytická hydrogenace (180 – 200 °C, 2 – 4 h, Ni-NiO/SiO<sub>2</sub>, p = 0,2 - 0,4 MPa) a závěrečná fáze rafinace jedlých olejů (220 – 260 °C, 1 – 3 h, 2 - hPa) jsou považovány za nejdrastičtější vysokoteplotní operace v potravinářském průmyslu. Hydrogenované oleje jsou zpravidla deodorovány, tudíž se jedná o kombinovaný termický/katalytický účinek. I přesto jsou finálním produktem oleje a tuky prosté alkylhydroperoxidů (PČ ≤ 0,5 mekv.akt. O/kg), glycerofosfolipidů (≤ 1 mg P/kg), volných mastných kyselin (< 0,1 hm. %), chlorofylů (< 0,05 mg/kg), ostatních prooxidantů (< 0,2 mg Fe/kg) a pachových látek (< 1 µg/kg). Významným kladem dlouhodobého záhřevu je téměř kvantitativní odstranění karotenoidů.



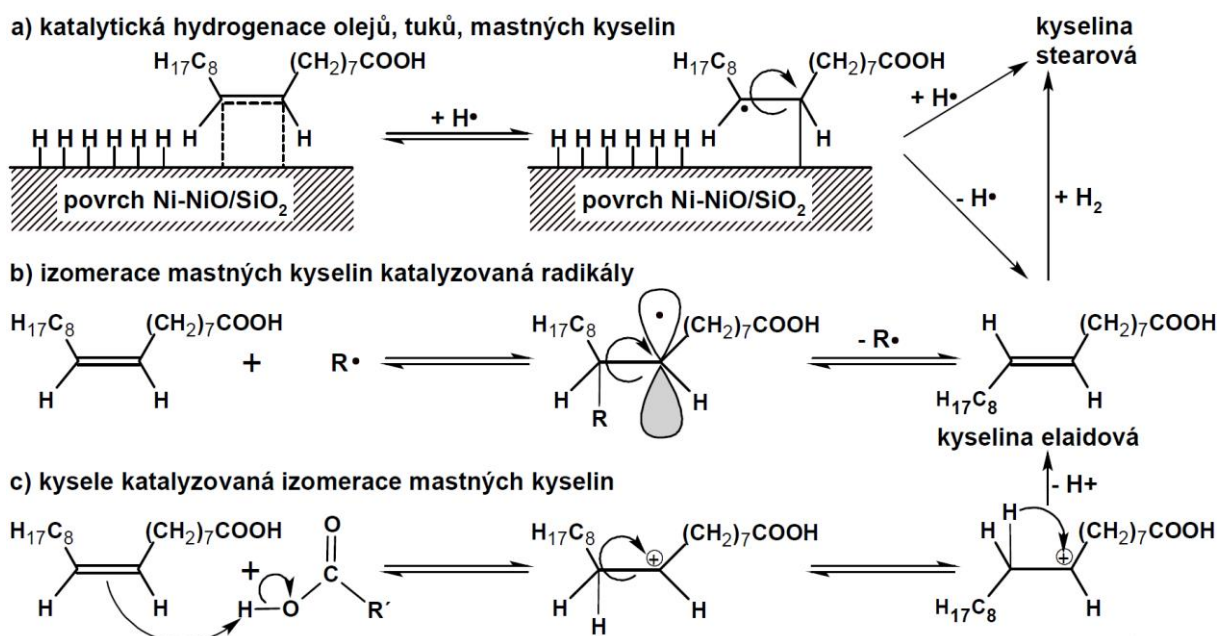
**Obr. 8** Vysokoteplotní degradace  $\beta$ -karotenu při fyzikální rafinaci palmového oleje (260 °C).

Proces je označován jako vysokoteplotní bělení a účelně využívá termické pericyklické transformace. Simulované odkyselování (fyzikální rafinace) surového palmového oleje při 260 °C v laboratoři (obr. 8) prokázalo, že majoritními těkavými produkty jsou toluen, xyleny, 2,6-dimethylnaftalen či  $\beta$ -jonen (3,3,7-trimethyl-2,4-dihydro-1*H*-naftalen), které se koncentrovaly v destilátu mastných kyselin (obr. 2) pro oleochemické využití. Proces je jediným způsobem, jak efektivně bělit surový palmový olej s extrémně vysokým obsahem karotenů ( $10^2$  mg/kg)<sup>15</sup>. Součinné reakce zahrnují sérii konrotačních ( $8\pi$ -elektronů) a disrotačních ( $6\pi$ -elektronů) elektrocyklizací, následkem čehož vzniká substituovaný bicyklo[4.2.0]okta-2,4-dien, který je prekurzorem prvního uvolněného molu *m*-xyleny. Analogický sled elektrocyklizací C33 polyenu poskytuje toluen a 1,6-bis(2,6,6-trimethylcyklohex-1-enyl)-3-methylhexa-1,3,5-trien, nebo další mol *m*-xyleny a 1,6-bis-(2,6,6-trimethylcyklohex-1-enyl)hexa-1,3,5-trien. Podobné spektrum aromatických sloučenin (toluen, xyleny a 2,6-dimethylnaftalen) se vyskytuje také v surové ropě, pravděpodobnými prekurzory jsou karotenoidy, případně terpeny z biosféry<sup>21</sup>. Analogické sloučeniny, zejména 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen, negativně ovlivňují aroma ryzlinku rýnského, jejich původ lze opět hledat v degradaci lipofilních barviv.

Pachové látky a fragmenty karotenoidů se účelně odstraňují v jediném kroku při destilaci s přehřátou vodní parou. Ve stejném stupni lze termickým účinkem eliminovat rizikové sloučeniny z prvovýroby, jako jsou rezidua pesticidů nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. Proces však generuje nové procesní kontaminanty: geometrické a polohové izomery mastných kyselin, cyklické mastné kyseliny či oligomery triacylglycerolů, které v jedlých olejích kvůli fyzikálně-chemickým vlastnostem opět zůstávají. Zvláště nežádoucí je dietární příjem nenasycených mastných kyselin s *trans* konfigurací, které souvisí se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění a dalších civilizačních chorob. Není překvapivé, že *trans* nenasycené mastné kyseliny byly prokázány i v lidském lipidu<sup>22</sup>. V konečném důsledku zde mohou negativně ovlivnit fluiditu a funkční vlastnosti biomembrán po inkorporaci v glycerofosfolipidech - amfifilních stavebních prvcích organismu. Do roku 2006 byla hlavním zdrojem *trans* izomerů mastných kyselin v tukových výrobcích (30 – 40 %) technologie parciální katalytické hydrogenace<sup>7,9</sup>. V roce 2003 však bylo přijato nařízení FDA (68 FR 41434) o povinném značení *trans*-MK s účinností od 1. 1. 2006, výrobci jsou nuceni opustit proces parciální katalytické hydrogenace. V roce 2005 poklesl prodej hydrogenáčnických katalyzátorů o 50 %, klesá poptávka po hydrogenovaných tucích a objevují se první produkty s deklarací „nulového“ obsahu *trans*-MK. Důsledkem značení *trans*-MK byla reformulace potravinářských výrobků, zejména pečiva, cukrovinek, tuků na pečení.

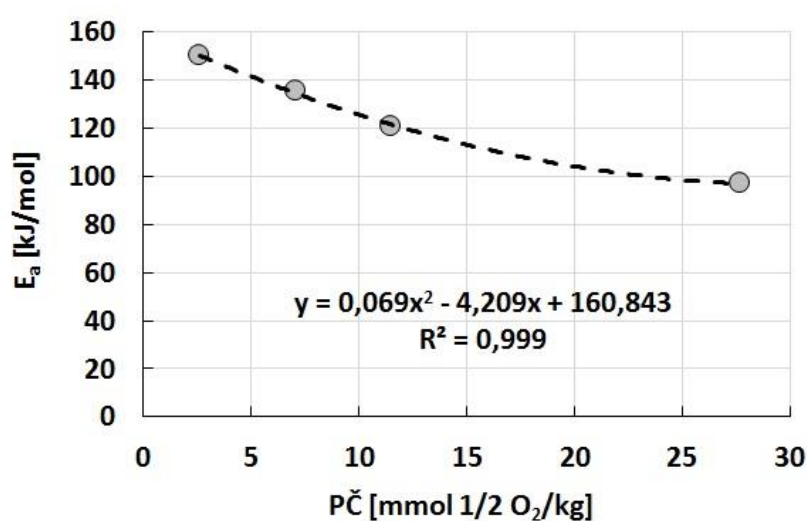
Hlavním rizikem dietárního příjmu mastných kyselin s *trans* konfigurací je negativní vliv na metabolismus lipoproteinů v séru, epidemiologické studie prokázaly souvislost mezi příjmem *trans*-MK a zvýšením obsahu lipoproteinových částic o nízké hustotě (LDL), jež transportují cholesterol z jater do periferních tkání. *Trans*-MK současně stojí za snížením hladiny lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) v krvi, které transportují cholesterol zpět, taková kombinace je považována za vysoce proatherogenní a tudíž rizikovou. FDA opětovně reaguje a 18.6.2015 zbavuje parciálně hydrogenované tuky ( $> 4 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ ) statusu GRAS (Generally Recognized as Safe) nařízením 80 FR 34650, od 1.1.2021 nebudou schváleny žádné výrobky s parciálně hydrogenovanými tuky. Obdobně reaguje Evropská komise nařízením 2019/649.

Nabízí se otázka, jakým způsobem lze dosáhnout srovnatelných fyzikálních a senzorických vlastností tukových výrobků s absencí *trans*-MK? Ekonomicky přijatelnou možností je kombinace totální hydrogenace kapalných olejů (obr. 9a) a alkalicky či enzymově katalyzované transesterifikace. Náhoda přeje připraveným; výrobci zachází ještě dále a snaží se zcela omezit používání plně ztužených tuků pevnými podíly palmstearinu vyrobeného frakční krystalizací. Zda přežije technologie alkalické transesterifikace 21. století je rovněž otázkou. Významným zjištěním našeho autorského kolektivu je úspěšné použití komerčního enzymu Lipozyme TL IM (Novozymes) při transesterifikaci strukturních tuků s vysokým bodem tání (až  $63^\circ\text{C}$ ) v blízkosti teplotního maxima enzymu<sup>23</sup>. Aktuálně je hlavním dietárním zdrojem *trans*-MK tuk přežvýkavců (mléčný tuk, maso) a plně rafinované rostlinné oleje, distribuce produktů je však rozdílná, stejně tak pohled na bioaktivitu lipidů.



**Obr. 9** Mechanismus vzniku *trans*-mastných kyselin při hydrogenaci a rafinaci olejů a tuků.

Vysokoteplotní geometrická a polohová izomerace TAG probíhá při deodoraci a v menší míře při adsorpčním bělení jedlých olejů. Vznik termodynamicky stabilních *trans*-MK pravděpodobně není monomechanistický, protože může být katalyzován radikály (obr. 9b) a také kyselé (obr. 9c). Proto jsme simulovali vliv alkyldihydroperoxidů na rychlost degradace kyseliny linolové v systému s praktickou absencí volných mastných kyselin. Ze závislosti reakční rychlosti na teplotě v přítomnosti definovaného množství alkyldihydroperoxidů byly vypočítány hodnoty aktivačních energií  $E_a$ . Bylo zřejmé, že degradace kyseliny linolové je silně teplotně závislá (obr. 10) a stopy ROOH mohou iniciovat vznik *trans* izomerů MK, zkrátit reakční dobu a indukční periodu reakcí<sup>24</sup>.

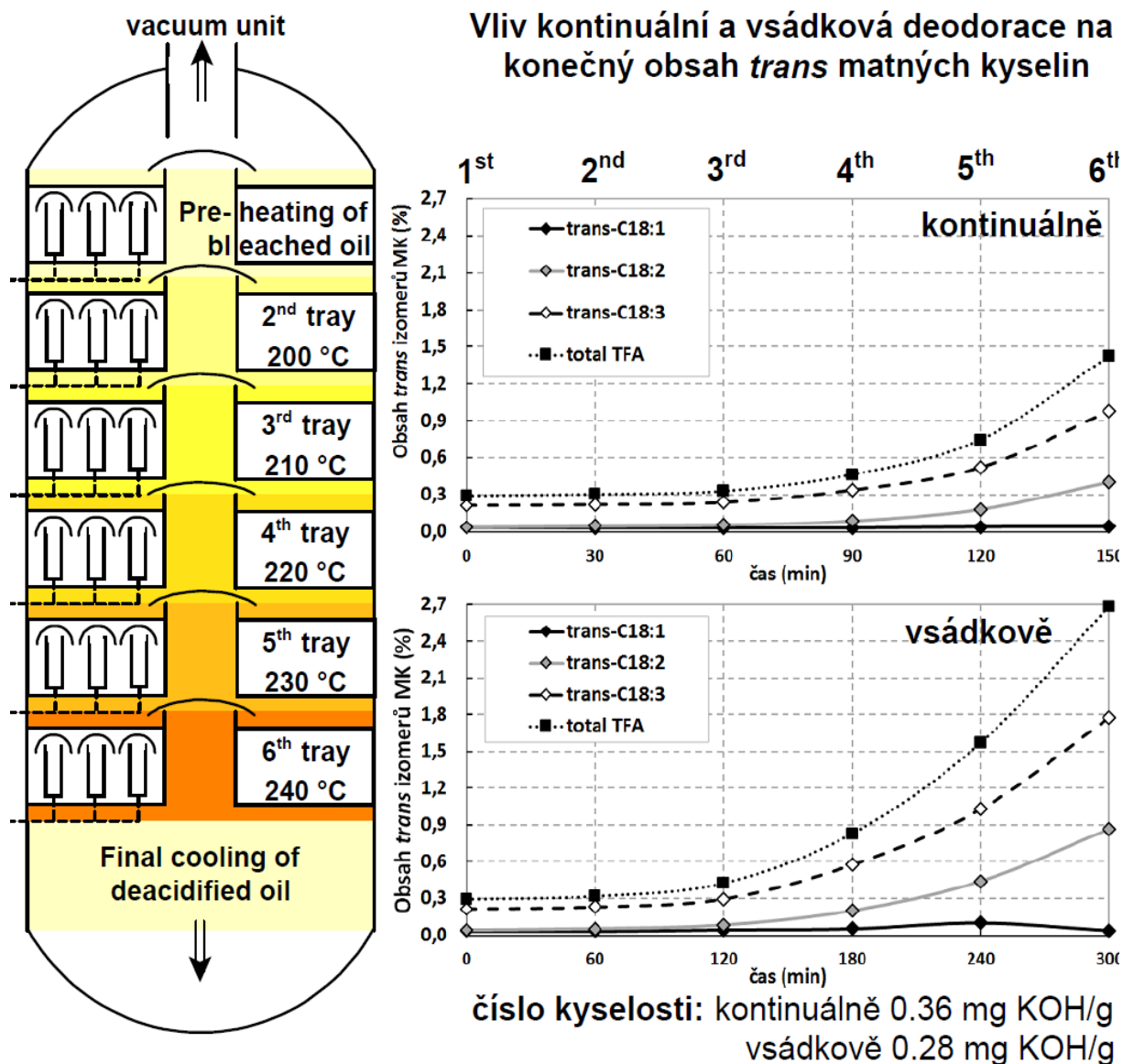


| Teplota<br>[°C] | PČ<br>[mmol 1/2O <sub>2</sub> /kg] | k<br>[s <sup>-1</sup> ] |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------|
| 240             | 2,61                               | 0,0053                  |
|                 | 7,12                               | 0,0069                  |
|                 | 11,53                              | 0,0092                  |
|                 | 27,68                              | 0,013                   |
| 260             | 2,61                               | 0,0198                  |
|                 | 7,12                               | 0,0227                  |
|                 | 11,53                              | 0,0266                  |
|                 | 27,68                              | 0,0305                  |

**Obr. 10** Vliv teploty, obsahu hydroperoxidů na rychlost degradace kyseliny linolové a  $E_a$ .

Geometrická izomerace nenasycených TAG je kineticky řízený proces, reaktivita mastných kyselin při vysokoteplotní geometrické izomeraci stoupá v řadě monoenové < dienové < trienové mastné kyseliny. Tvorba *trans* izomerů MK je, podobně jako smíšená fragmentace alkyldihydroperoxidů, homolyticko-heterolytickým dějem a význam kyselé

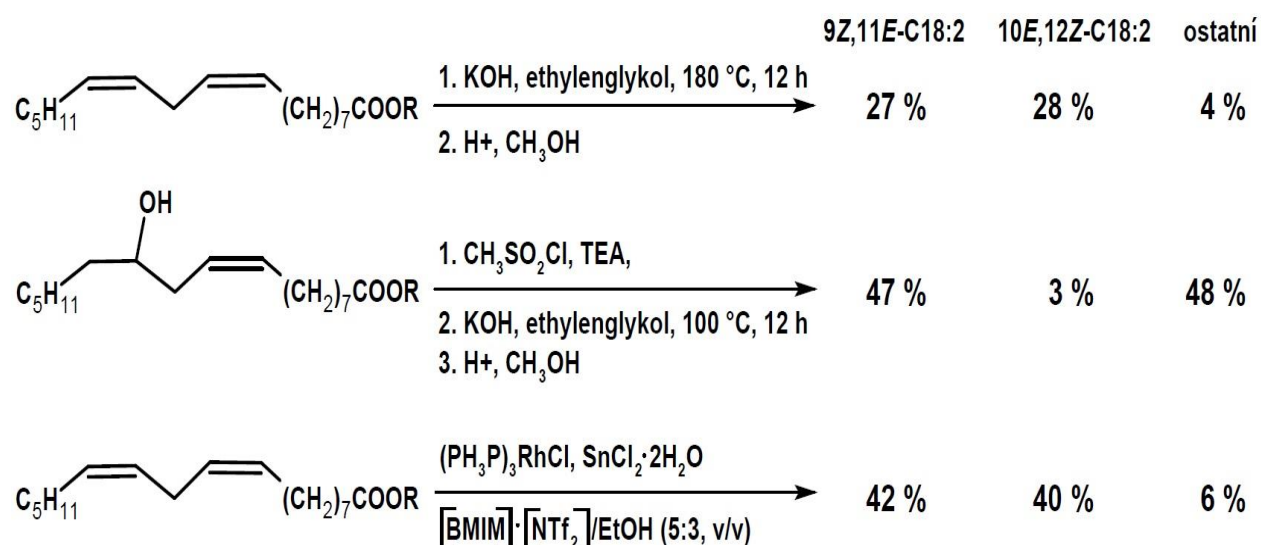
katalýzy nelze zanedbat. Kysele katalyzované reakce jsou důležitými přeměnami v organické technologii, využití nachází při izomeracích, alkylacích, eliminacích, oligomeracích či přesmycích. V oleochemii se uplatňují při štěpení tuků, dehydrataci ricinového oleje, výrobě alkydových pryskyřic či biopaliv 2. generace. Při rafinaci jedlých olejů se jedná o nežádoucí děj. Při bělení (90 - 110 °C, 40 min, inertní atmosféra) na kyselé aktivovaných adsorbentech vznikají geometrické izomery (obr. 9c) mastných kyselin, zatímco při odkyselování rostlinných olejů (240 – 260 °C), kdy je reakce autokatalyzována volnými mastnými kyselinami, vznikají rovněž konjugované dvojné vazby<sup>15,24</sup>. Rozdíl mezi kontinuálním a vsádkovým procesem ukazuje obr. 11. Moderní destilační kolony s prestripovací sekci minimalizují tvorbu *trans* izomerů mastných kyselin ( $10^{-1}$  hm. %) a ostatních kontaminantů.



**Obr. 11** Vliv průmyslového uspořádání fyzikální rafinace na tvorbu *trans* izomerů MK.

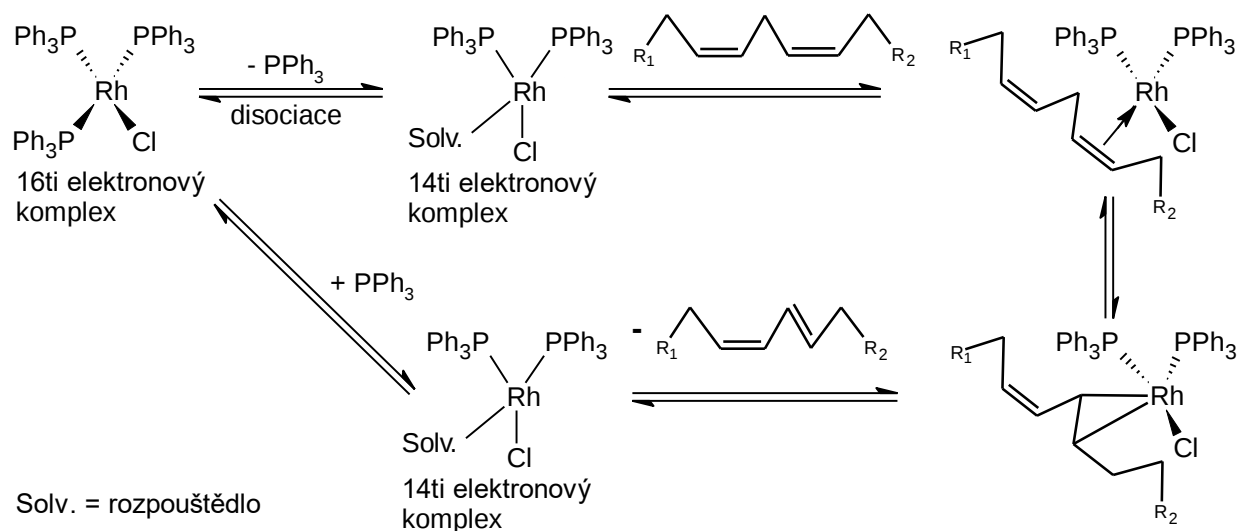
Mezi konjugovanými mastnými kyselinami, které vznikají při deodoraci/fyzikální rafinaci olejů a tuků, dominovaly kyseliny 9*Z*,11*E*-oktadeka-9,11-dienová a 10*E*,12*Z*-oktadeka-10,12-dienová. Konjugované mastné kyseliny jsou základními reaktanty při tvorbě oligomerů Diels-Alderovým mechanismem<sup>15,18,24</sup>. Jedná se o termickou [4+2]-cykloadici elektronově bohatého konjugovaného dienu s elektronově deficitním dienofilem (kyselina olejová, (*E*)-alk-2-enaly,  $\alpha,\beta$ -nenasycené *n*-oxokyseliny či chinony). Při Diels-Alderově reakci se vytváří dvě nové vazby  $\sigma$  a výsledným produktem je cyklohexenový kruh, reakční mechanismus je bez meziproduktů s jedním přechodovým cyklickým stavem<sup>25,26</sup>. Diels-Alderova reakce probíhá, jsou-li dvojné vazby konjugovaného dienu v konformaci *s-cis*, selektivita a rychlost cykloadičních reakcí je významně ovlivněna substitucí dienofilu skupinami se záporným indukčním efektem<sup>25</sup>.

Konjugované deriváty kyseliny oktadekadienové nebyly komerčně dostupné, proto byly připraveny alkalickou izomerací slunečnicového oleje či methyl linoleátu v ethylenglykolu, dehydratací ricinového oleje a především konjugací dvojných vazeb s použitím Wilkinsonova katalyzátoru (obr. 12), který se standardně používá při homogenní hydrogenaci organických sloučenin<sup>27,28</sup>. Reakční sled je iniciován disociací trifenyfosfinového ligandu (- PPh<sub>3</sub>) za vzniku 14elektronového komplexu RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, analogické reakční schéma lze očekávat i v případě homogenní dvojfázové konjugace dvojných vazeb, přičemž na místo oxidativní adice vodíku se k centrálnímu atomu Rh váže kyselina linolová nebo její derivát jako organický ligand s vazbou  $\pi$  (obr. 13).



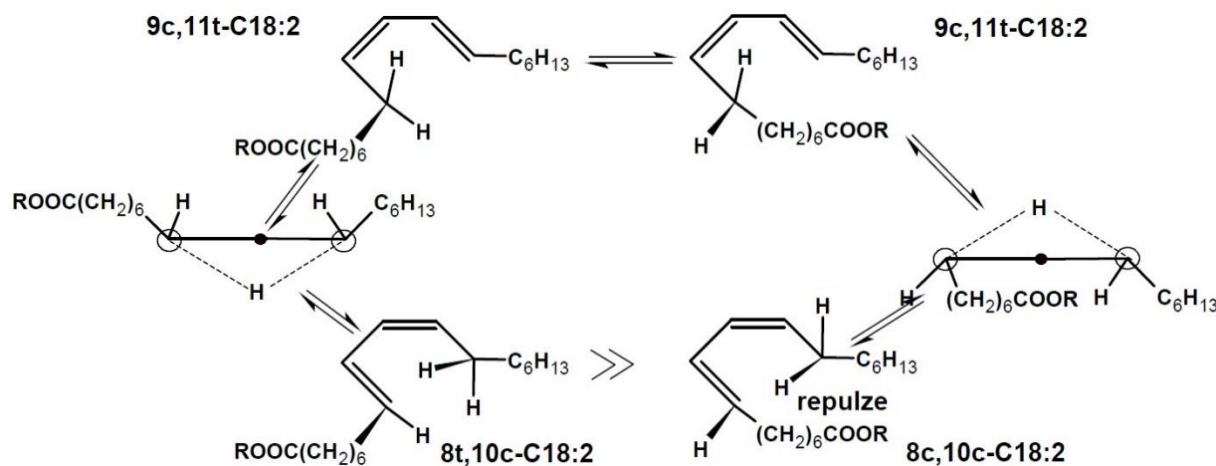
**Obr. 12** Příprava konjugovaných izomerů oktadekadienových kyselin.

Podobné reakční schéma lze uplatnit i v případě homogenní hydrosilylace či dekarboxylace. V navrženém reakčním mechanismu<sup>27,28</sup> by z hlediska teorie molekulových orbitalů měla být zásadní rovnováha mezi přenosem náboje ve směru alken  $\rightarrow$  rhodium a hraniční strukturou s metalocyklopropanovým kruhem s rehybridizací atomu C na  $sp^3$ .



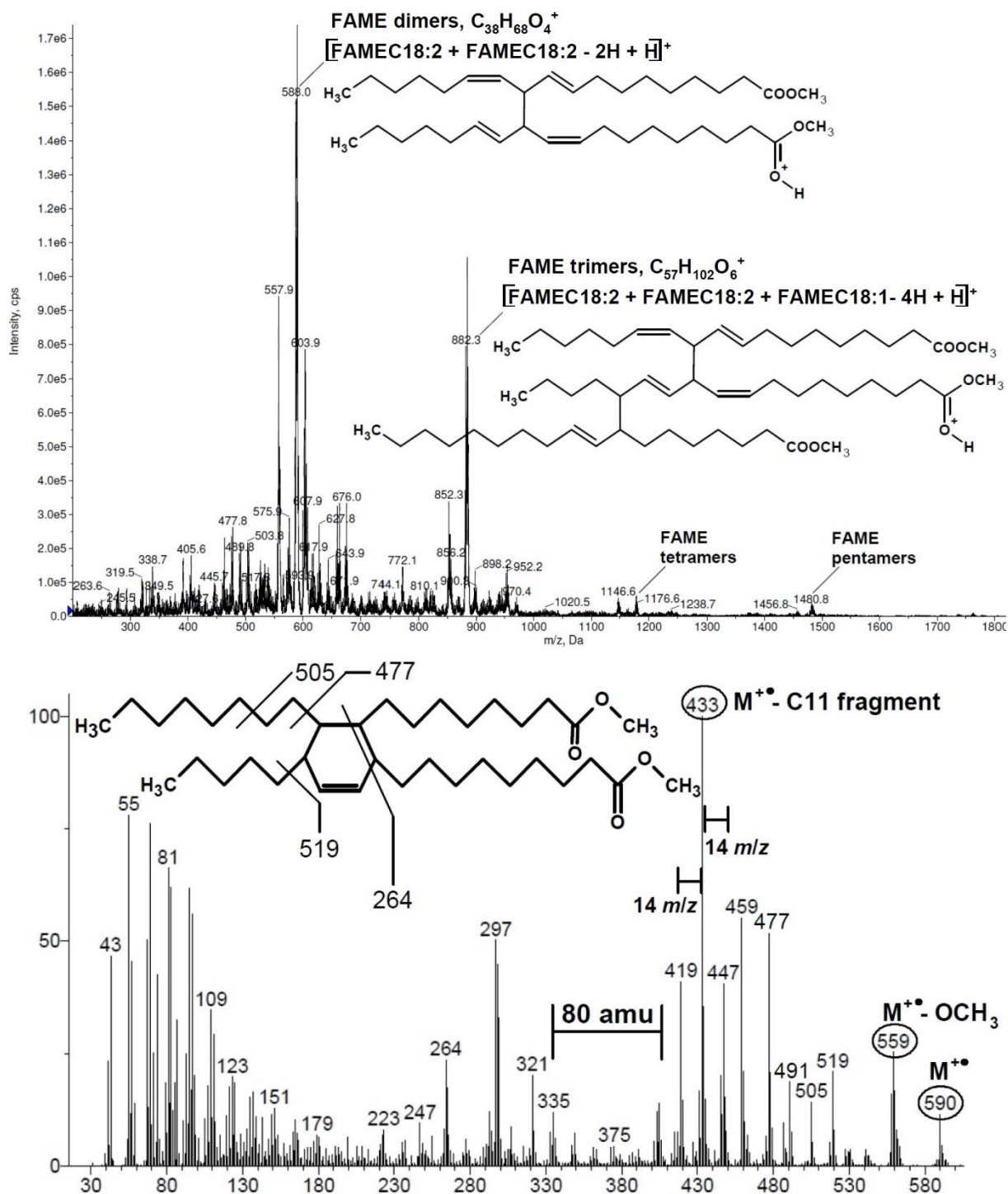
**Obr. 13** Reakční mechanismus dvojfázové homogenní konjugace derivátů kyseliny linolové.

Oleochemická výroba dimerních mastných kyselin je katalyzovaná zeolity ZSM-5, přičemž majoritní substituované cyklohexenové dimery a oligomery vznikají součinným mechanismem. Tvorbu vedlejších reakčních produktů, rozvětvených mastných kyselin, lze vysvětlit vznikem intermediárních cyklických karbokationtů. Oligomery triacylglycerolů vznikají již v surových olejích radikálovým mechanismem za přístupu kyslíku. Protože se nacházejí v polární frakci společně s oxidovanými TAG, jedná se o tzv. oxopolymery<sup>29</sup>. Při oligomeraci TAG bez přístupu kyslíku vzniká třetí skupina nepolárních sloučenin (0.1-1.0 %).



**Obr. 14** Mechanismus [1,5]-sigmatropního přesmyku konjugované oktadekadienové MK.

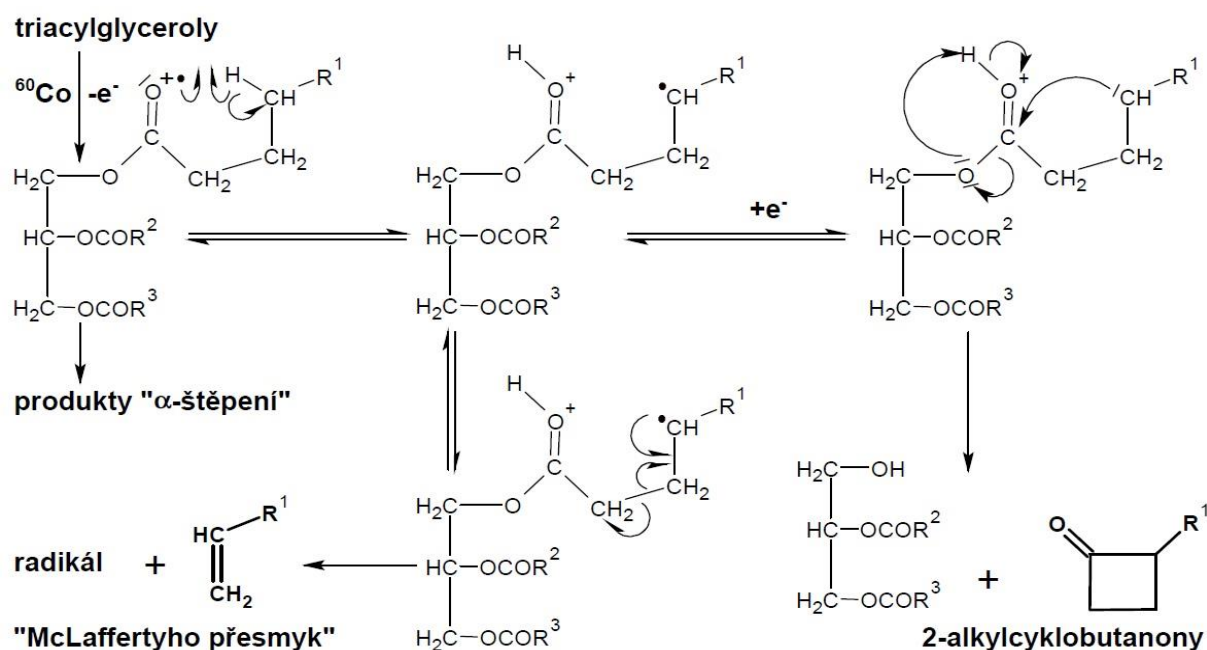
Třetí skupina oligomerů vzniká při rafinaci jedlých olejů, konjugované mastné kyseliny se však reakce účastní pouze částečně. I přesto podléhají skupině pericyklických reakcí, tzv. [1,5]-sigmatropním přesmykům (obr. 14). Spojením HPSEC s APCI-MS byla umožněna identifikace oligomerních TAG, analýza prokázala dominantní sloučeniny vzniklé terminací radikálů, zatímco produkty Diels-Alderovy reakce byly spíše minoritní (obr. 15).



**Obr. 15** Kvalitativní analýza oligomerů triacylglycerolů a mastných kyselin.

### 2.3. Vliv rafinace a chemické modifikace na obsah esterů 3-MCPD a glycidolu

V kapitolách 2.1 a 2.2 byly shrnuty aktuální poznatky o reaktivitě uhlovodíkového řetězce MK, při zpracování potravin dochází také k reakcím karboxylových skupin nebo glycerolového zbytku. Jednou z takových přeměn je pyrolýza acylglycerolů a následné dehydratace volného glycerolu, které poskytují jako finální produkt akrolein. Lipidy nemusí být vystaveny pouze tepelnému záhřevu, při konzervaci potravin se účelně využívá  $\gamma$ -záření radionuklidů kobaltu  $^{60}\text{Co}$  nebo cesia  $^{137}\text{Cs}$ , dávka nesmí převyšovat 10 kGy (nařízení 1999/3/EC) a výrobci i dovozci mají informační povinnost o aplikaci ionizujícího záření<sup>30</sup>. Radiosterilací se ošetřuje koření, zeleninové ochucovací přípravky, sušené aromatické byliny, zelenina, maso či mořské plody, jedná se o vhodnou náhradu fumigantů, jež mohou být prekursori řady potenciálně karcinogenních a perzistentních sloučenin. Hlavní výhodou ozařování potravin je možnost sterilace přímo v obalu bez znatelného ovlivnění sensorických a fyzikálních vlastností produktů. Účinek radiosterilace je širokospektrální, efektivně inaktivuje také termorezistentní spory, přičemž gramnegativní bakterie jsou vůči  $\gamma$ -záření citlivější. Důvodem je absence teichoové kyseliny v buněčné stěně, tenčí vrstva peptidoglykanů a přítomnost fosfolipidů ve vnější membráně. Kombinovaný efekt vůči gramnegativním bakteriím spočívá v přímém mutagenním účinku na DNA a nepřímém vlivu volných radikálů uvolněných při radiolýze vody na fosfolipidy. Při radiosterilaci dochází rovněž k degradaci lipidů, zejména acylglycerolů a volných mastných kyselin (obr. 16)<sup>30</sup>.



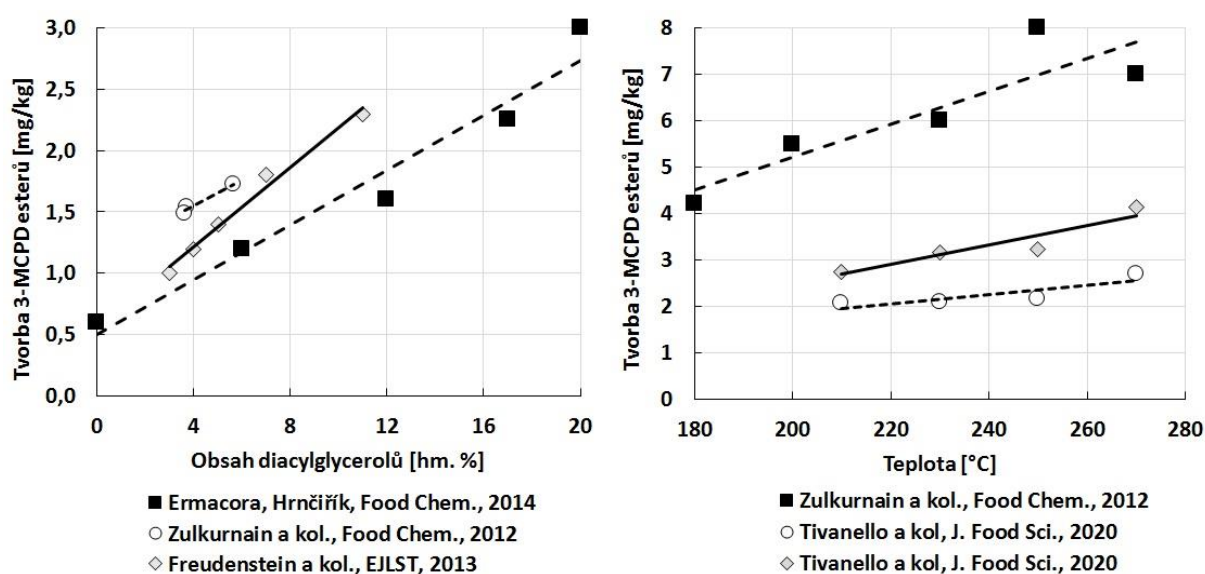
Obr. 16 Mechanismus vzniku 2-alkylcyclobutanonů a alkenů z triacylglycerolů.

Majoritními degradačními produkty jsou 2-alkylcyklobutanony, alkeny a alkany. Mechanismus jejich vzniku je identický se základními typy fragmentací při elektronové ionizaci a nutně zahrnuje tzv.  $\alpha$ -štěpení, McLaffertyho přesmyk a další transformace (obr. 16). Vzhledem k tomu, že se radiosterilací ošetřuje pouze zlomek potravin, je tvorba potenciálně cytotoxických 2-alkylcyklobutanonů okrajovou záležitostí. Skutečným celosvětovým problémem je vznik esterů 3-monochlorpropan-1,2-diolu (3-MCPD) a esterů glycidolu v rafinovaných olejích a tucích<sup>31,32</sup>. Procesní kontaminanty, identifikované v roce 2006 a 2009, ovlivnily významným způsobem získávání, rafinaci a modifikaci palmového oleje a jeho frakcí<sup>31-34</sup>, bez technologických inovací by zpracovatelé nemohli použít značnou část produkce v potravinářském sektoru.

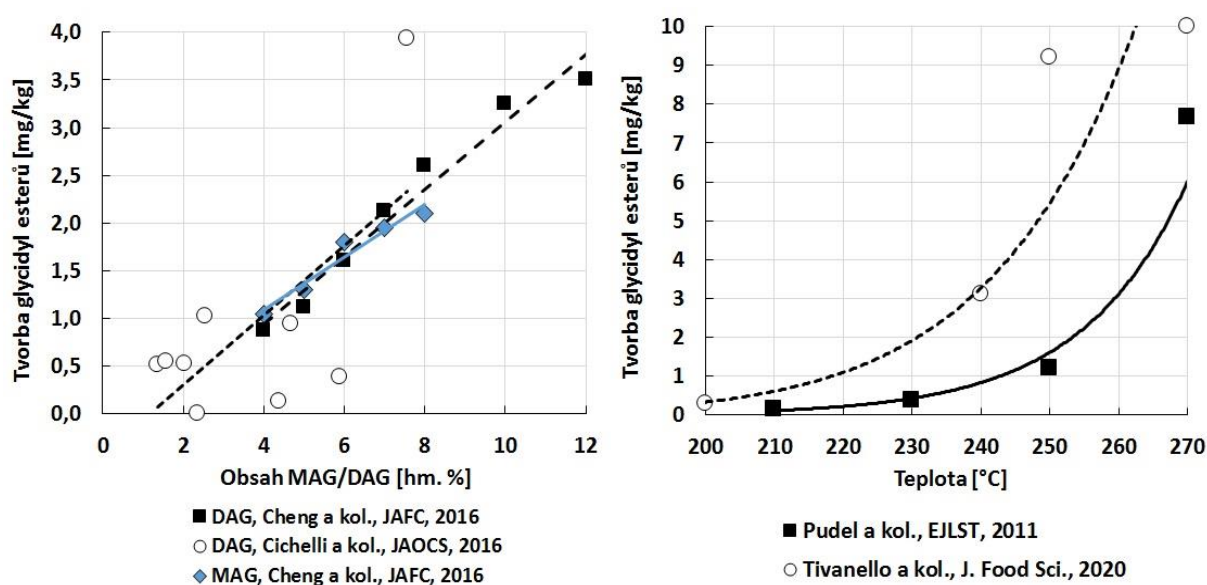
Monoacylglyceroly a zejména diacylglyceroly přítomné v surových olejích jsou spolu s volnými mastnými kyselinami produkty lipolýzy triacylglycerolů. Z těchto sloučenin vznikají acylderiváty monochlorpropandiolu a glycidolu. Surové rostlinné oleje získávané z dužnatých plodů, jako jsou palmový, palmojádrový a olivový, obsahují 2 – 10 hm. % diacylglycerolů dle rychlosti a technické úrovně zpracování<sup>33,34</sup>. Důsledkem toho je, že některé oleje, zvláště pak rafinovaný palmový, palmojádrový a olivový olej obsahují obvykle 1 – 5 mg/kg esterů 3-MCPD (3-MCPD estery vyjádřené jako volný 3-MCPD) a 0,5 – 5 mg/kg esterů glycidolu (estery glycidolu vyjádřené jako glycidol). Surové rostlinné oleje získávané ze semen a bobů jako jsou řepkový, slunečnicový a sójový, které obsahují menší množství diacylglycerolů (0,5 – 2,0 hm. %), mají po fyzikální rafinaci obvyklý obsah < 1,0 mg/kg 3-MCPD a < 1,0 mg/kg glycidolu. Deriváty 3-MCPD a glycidolu jsou kancerogenní nebo potenciálně kancerogenní, suspektně genotoxické a mají vysoce negativní vliv na mužskou plodnost<sup>33,34</sup>. Nařízením komise (EU) č. 2018/290 ze dne 26. 2. 2018 byly stanoveny maximální limity kontaminujících esterů glycidolu v tukových výrobcích na 1 mg/kg (jako glycidol), v případě potravin pro malé děti a kojence jsou limity poloviční.

V procesu adsorpčního bělení jsou z oleje odstraněny pigmenty a prooxidanty. Bělicí hlinka je však hlavním zdrojem chloridových iontů, jelikož je aktivována kyselinou chlorovodíkovou. V posledním stupni rafinace (deodorace) je olej temperován na vysokou teplotu, až 260 °C, při které se odstraňuje řada nežádoucích sloučenin destilací s vodní parou. Přítomné diacylglyceroly, monoacylglyceroly, chloridové ionty, vysoká teplota a kyselá katalýza volnými mastnými kyselinami iniciují vznik nežádoucích sloučenin, tedy acylderivátů 3-MCPD a 2-monochlorpropan-1,3-diolu (2-MCPD). Kromě toho přímo z di- a monoacylglycerolů a hypoteticky i výše zmíněných chlorovaných sloučenin vznikají glycidyl

estery. Estery 2,3-dichlorpropan-1-olu, 1,3-dichlorpropan-2-olu, případně další minoritní chlorované sloučeniny, které byly nalezeny v bílkovinných hydrolyzátech, nebyly doposud nalezeny<sup>35</sup>. Od roku 2010 probíhal intenzivní průmyslový výzkum s cílem nalézt kritické parametry, které vedou ke vzniku acylderivátů 3-MCPD. Vznik esterů 3-MCPD (vyjádřeno jako 3-MCPD) byl lineárně závislý na obsahu diacylglycerolů (DAG) a teplotě, deodoraci nad 200 °C lze považovat za kritickou (obr. 17). Autoři prokázali, že DAG nejsou jedinými prekurzory, neboť při absenci parciálních esterů glycerolu vzniká  $\approx 0,5$  mg/kg esterů 3-MCPD<sup>36-39</sup>. Teplotní závislost tvorby esterů glycidolu na obr. 18 byla exponenciální, kritický obsah DAG byl mezi 2 až 4 %<sup>39-42</sup>.

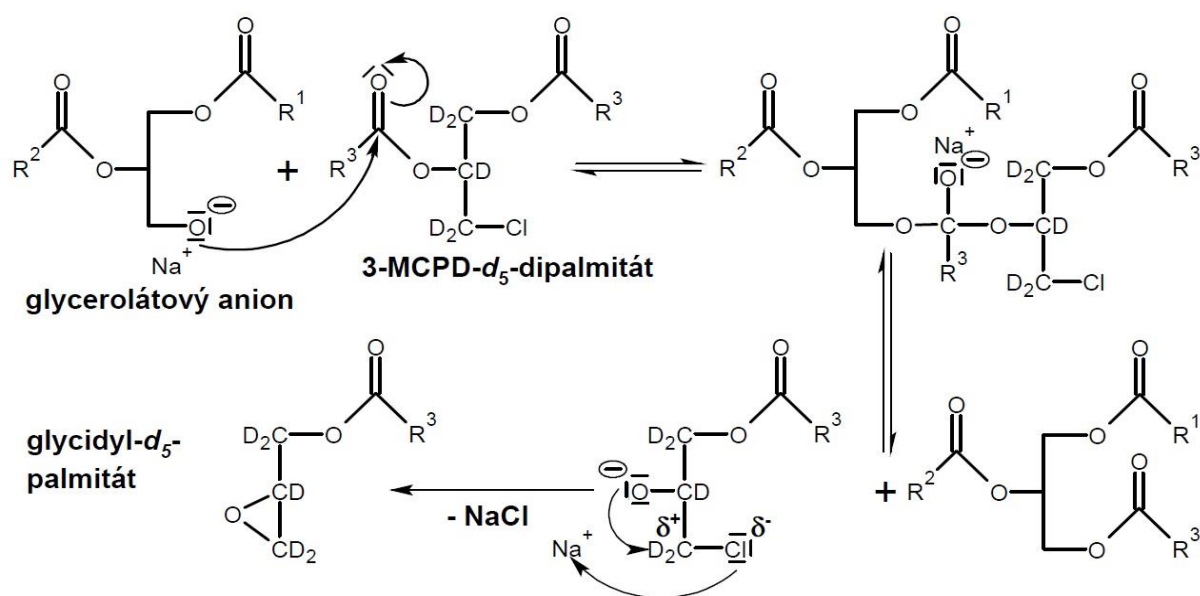


**Obr. 17** Vliv lipolýzy vstupního oleje, teploty na tvorbu esterů 3-MCPD (jako 3-MCPD)<sup>36-39</sup>.



**Obr. 18** Vliv lipolýzy vstupního oleje a teploty na tvorbu esterů glycidolu (jako glycidol)<sup>39-42</sup>.

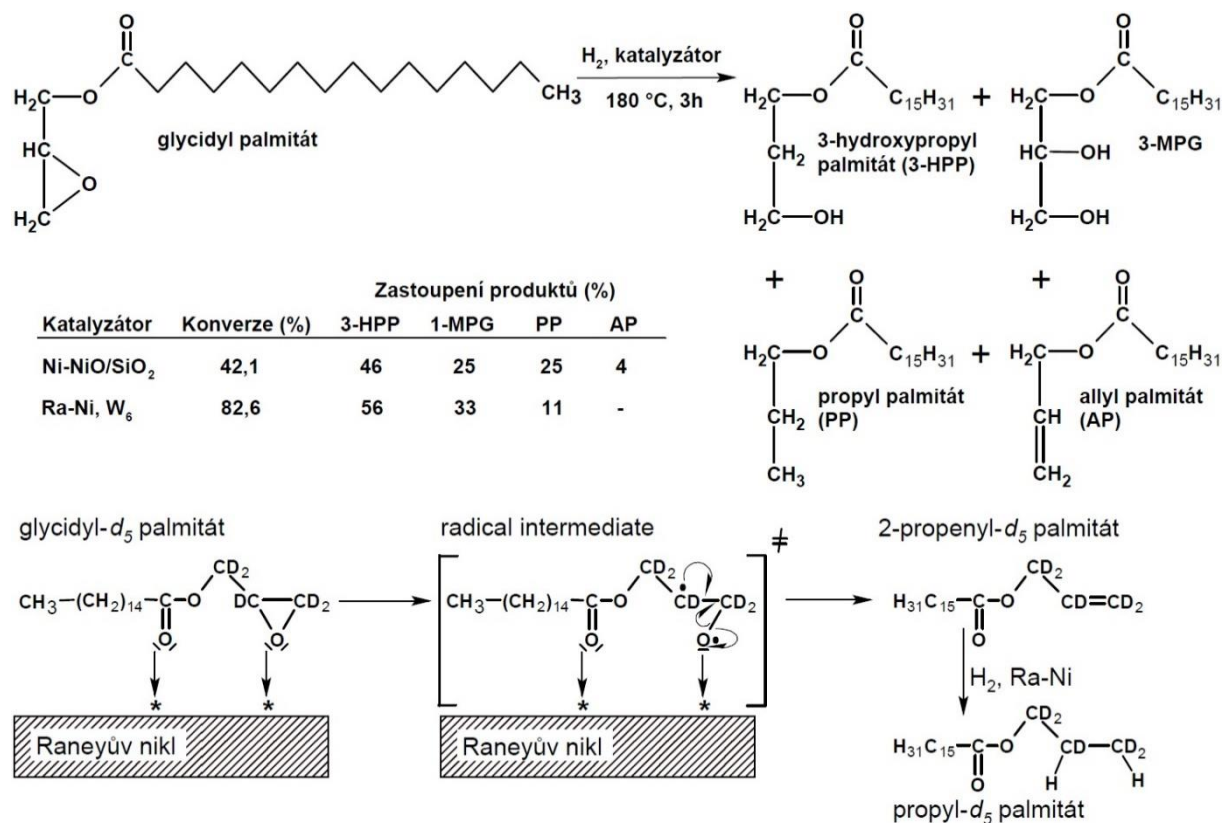
Procesní kontaminanty, estery 3-MCPD a glycidolu, představují velký problém pro zpracovatele palmového oleje a jeho frakcí. Naším cílem bylo odstranění nežádoucích sloučenin stávajícími technologiemi, tedy bez dalších investičních nákladů, nároků na prostory a obsluhu. Chemicky značené sloučeniny nám umožnily pochopit vliv provedených úprav na kontaminanty. Ve spolupráci s prof. Šmidrkalem a skupinou prof. Velíška jsme dospěli k závěru, že v rostlinných olejích a tucích lze v procesu deodorace či fyzikální rafinace zabránit vzniku esterů 2- a 3-MCPD přidávkem báze ( $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , alkoxidy)<sup>33</sup>. Takový způsob odstranění procesních kontaminantů se zdál slibný pro průmyslovou praxi, proto byla podána patentová přihláška<sup>43</sup>. Později se ukázalo, že deodorovaný olej nebyl sensoricky zcela neutrální. Účinek báze na chlorderiváty mohl způsobit vznik esterů glycidolu (potenciální genotoxický karcinogen, skupina 2A), proto bylo od realizace patentu a průmyslového řešení ustoupeno. Výše zmíněná hypotéza byla následně potvrzena při reakci značeného 3-MCPD- $d_5$ -dipalmitátu s modelovými di- a triacylglyceroly. Stejný mechanismus byl potvrzen i v technologii transesterifikace jedlých olejů, přičemž katalýza methoxidem sodným způsobuje téměř kvantitativní konverzi esterů 3-MCPD na estery glycidolu. Transesterifikace lipázami nemá na procesní kontaminanty žádný vliv, proto bude v budoucnu jedním z dominantních způsobů modifikace tukových výrobků.



**Obr. 19** Transformace 3-MCPD- $d_5$ -dipalmitátu na glycidyl- $d_5$ -palmitát katalyzovaná bázemi.

Rafinace nemusí být finální úpravou rostlinných olejů, protože jedlé oleje jsou kapalné, tudíž nemají vhodnou konzistenci pro výrobu emulgovaných (margariny) a pokrmových (shorteningy) tuků. Rafinované rostlinné oleje se pro potravinářské účely dále

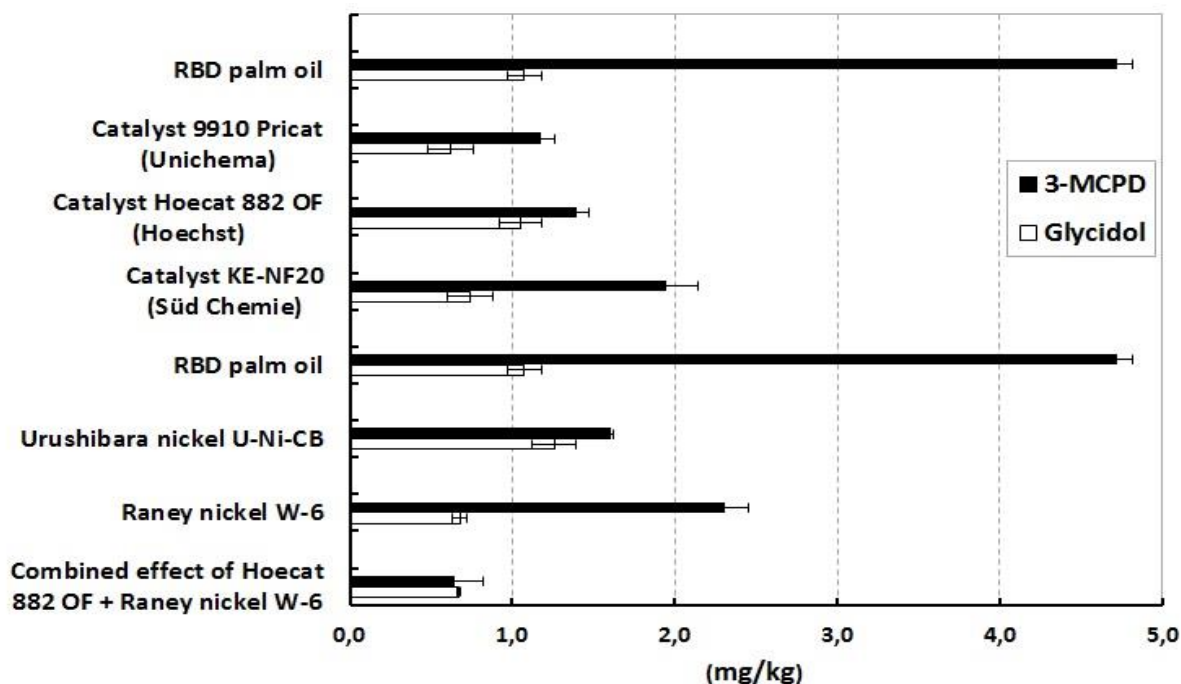
modifikují, zejména totální katalytickou hydrogenací, transesterifikací, frakcionací nebo kombinací těchto technologií. Výsledkem je strukturní tuk s požadovanými fyzikálními vlastnostmi. Při totální hydrogenaci olejů dochází účinkem vodíku za katalytického působení niklového katalyzátoru k vysycení dvojných vazeb mastných kyselin triacylglycerolů (konverze: 97 - 99 %, jodové číslo: 0,5 – 4,0 g I<sub>2</sub>/100 g tuku). Průmyslově se využívá niklový katalyzátor na nosiči (0,5 - 1 hm. %), např. křemelině, s aktivním katalytickým systémem Ni/NiO a stupněm redukce NiO na Ni 22 % při teplotách 180 - 200 °C a tlaku vodíku 1 - 5 bar. Kvalita vstupní suroviny limituje životnost a aktivitu niklového katalyzátoru, proto je vstupní surovinou rafinovaný rostlinný olej s obsahem vMK do 0,20 hm. % a obsahem fosforu 1 - 5 mg/kg.



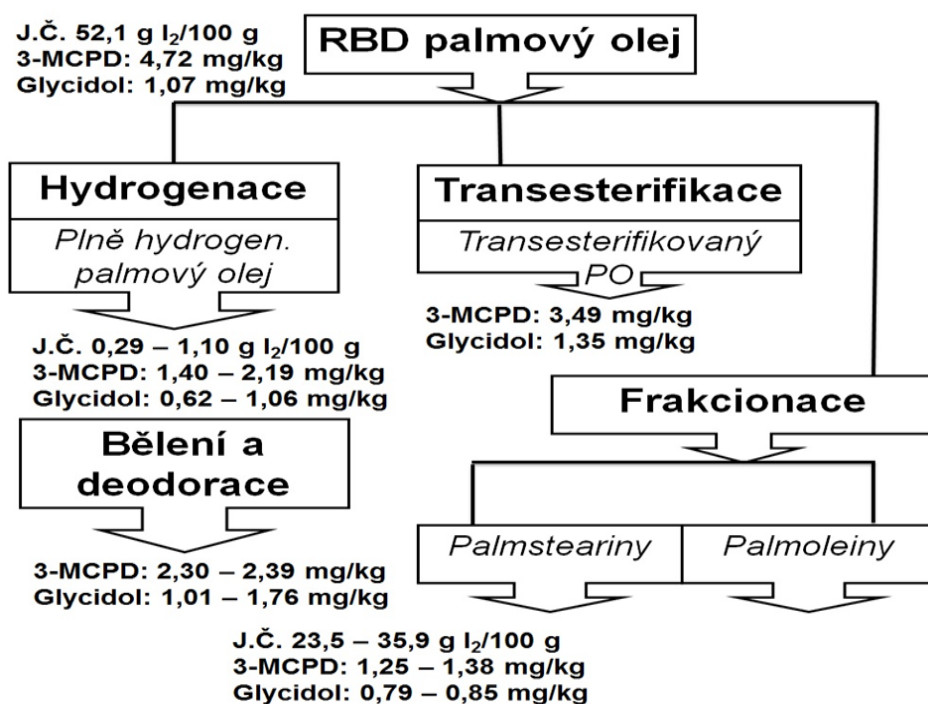
**Obr. 20** Degradace glycidyl palmitátu na komerčních katalyzátorech Ni-NiO a Ra-Ni, W<sub>6</sub>.

Niklové katalyzátory mají schopnost hydrogenolyzovat chlorované sloučeniny a epoxidy za vzniku monoacylglycerolů, acylderivátů propan-1,2-diolu, propan-1,3-diolu, propan-1-olu a propan-2-olu (obr. 20)<sup>34</sup>. Účinnost komerčních niklových katalyzátorů se liší, navíc je závislá na jejich typu, množství, dispergaci a dále na teplotě a čase (obr. 21)<sup>44</sup>. V průběhu experimentů jsme dospěli ke zjištění, že acylderiváty 3-MCPD, 2-MCPD a glycidyl

estery lze v procesu totální hydrogenace (150 až 200 °C) odstranit tak, že se na závěr procesu do hydrogenovaného rostlinného oleje při  $J\check{C} < 4 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$  přidají aktivnější katalyzátory jako je Raneyův nikl připravený podle Urushibary. Vliv modifikačních technologií na distribuci kontaminantů ve frakcích a produktech z palmového oleje znázorňuje obr. 22.



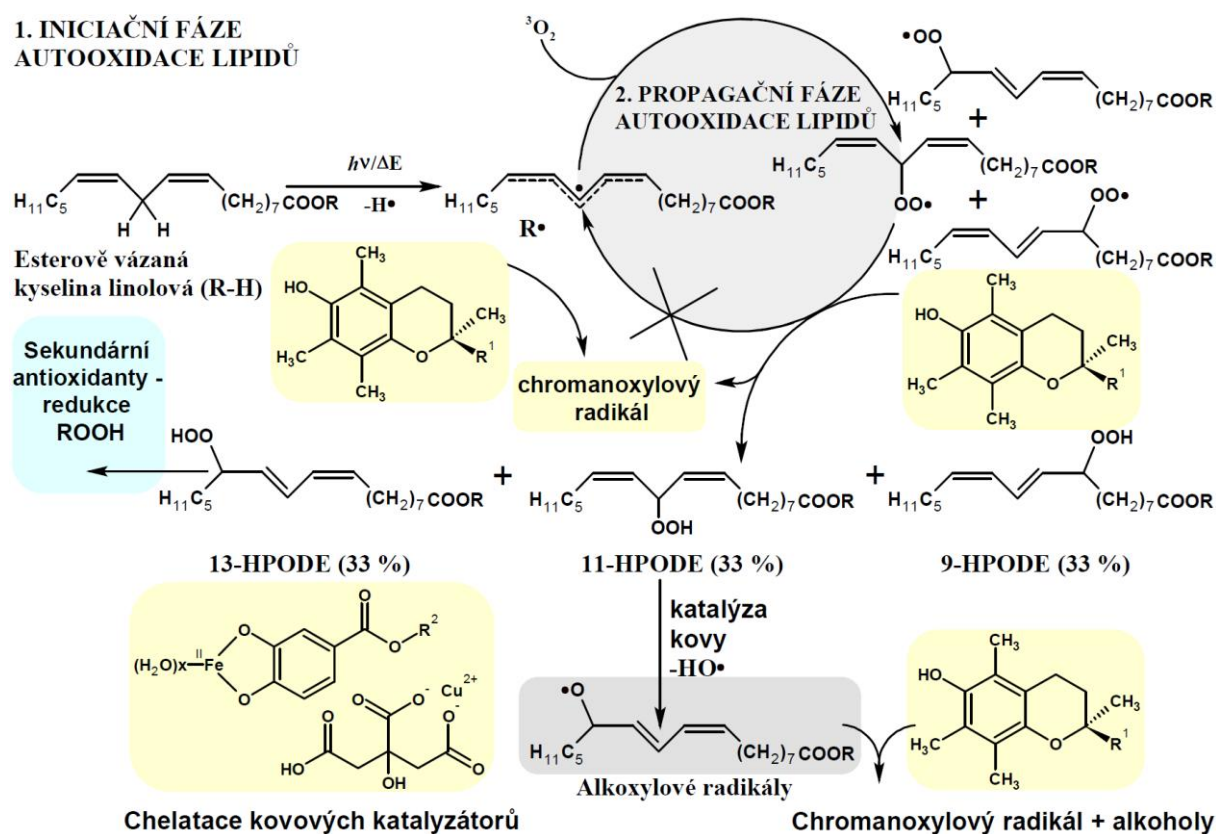
Obr. 21 Vliv komerčního niklového katalyzátoru na odstranění esterů 3-MCPD a glycidolu.



Obr. 22 Vliv modifikačních technologií na distribuci procesních kontaminantů ve výrobcích.

## 2.4. Degradace tokoferolů při deodoraci a fyzikální rafinaci olejů a tuků

Antioxidanty představují důležité inhibitory autooxidace materiálů komerčního i biologického významu, zpomalují pokles nutriční i sensorické hodnoty potravin<sup>9,45</sup>. Syntetické antioxidanty a jejich směsi mají značný ekonomický význam, neboť nachází uplatnění v petrochemickém průmyslu jako inhibitory gumovatění, antiozonanty, stabilizátory laků, pryskyřic a nátěrů. Běžnými antioxidanty v potravinářství i kosmetice jsou monofenolové sloučeniny 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT) a 2-*tert*-butyl-4-methoxyfenol (BHA), difenolový inhibitor 2-*tert*-butylhydrochinon (TBHQ) a polárnější estery gallové či kyseliny askorbové, které se hromadí na fázovém rozhraní<sup>9,14</sup>. V potravinářství je obsah syntetických antioxidantů regulován legislativou: 0,01 hm. % pro konkrétní sloučeninu; 0,02 hm. % je maximální přípustný obsah pro směsný přípravek.



**Obr. 23** Mechanismus inhibice propagační fáze autooxidace mastných kyselin antioxidanty.

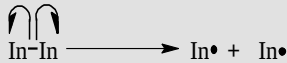
Podle mechanismu inhibice rozlišujeme primární antioxidanty (kyselina askorbová, tokoferoly, fenolové kyseliny a další polyfenoly), které reagují s alkylhydroperoxylovými a alkoxylovými radikály, zatímco sekundární antioxidanty (cystein, lipoová kyselina, methionin) redukují vzniklé alkylhydroperoxydy<sup>9,45</sup>. Mechanismus kombinovaného účinku

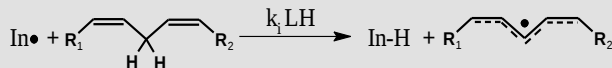
primárních a sekundárních antioxidantů s cheláty přechodných kovů na tvorbu alkylhydroperoxidů a jejich rozkladných produktů shrnuje obr. 23. Funkční primární antioxidant by měly mít standardní redukční potenciál poloreakce  $E^\ominus$  níže v elektrochemické řadě než alkoxylové, peroxylové, allylové a *bis*-allylové radikály, které regenerují (tab. I, II). Takový oxidačně-redukční děj je samovolný<sup>10,13</sup>. Antioxidační / oxidační účinek sloučenin je navíc koncentračně závislý<sup>9</sup>. Inhibiční účinek se projeví pouze v případě, že rychlost reakce primárního antioxidantu s volnými radikály je výrazně rychlejší než reakce, které jsou základem propagačního stupně autooxidace lipidů<sup>10,12</sup>.  $\alpha$ -Tokoferol s inhibiční rychlostní konstantou  $k_{INH}$  autooxidace kyseliny linolové ( $1 \cdot 10^6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) je účinným primárním antioxidantem (tab. II), neboť rychlost propagace oxidace je  $1 - 100 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (tab. II). Fenol s  $k_{INH} \approx 3000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , vysokou hodnotou BDE ( $368 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a nízkou hodnotou ionizačního potenciálu ( $818 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) není vhodným antioxidantem<sup>9,45</sup>. Reakce fenolu s radikály je současně termoneutrální.

Tabulka II Standardní napětí článku  $E^\ominus_{\text{cell}}$  (298 K, 101,325 kPa) jako kvantitativní měřítko termodynamické uskutečnitelnosti dílčích autooxidačních redoxních reakcí a inhibice peroxidace antioxidanty [podle Buettner, 1993; Koppenol, 1990]

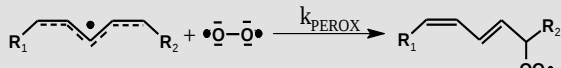
| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] |                |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| -                                | -                                | -                                                                                   | -              |
| -                                | -                                | 60                                                                                  | -              |
| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] |                |
| -                                | -83,68                           | $1 \cdot 10^9$                                                                      | $3 \cdot 10^8$ |
| 0,4                              | -38,59                           | 1 až 100                                                                            | 10 až 40       |
| $E^\ominus_{\text{cell}}$<br>[V] | $\Delta_r G^\ominus$<br>[kJ/mol] | rychlostní konstanta<br>[ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] |                |
| 0,5                              | -48,24                           | $1 \cdot 10^6$                                                                      | -              |

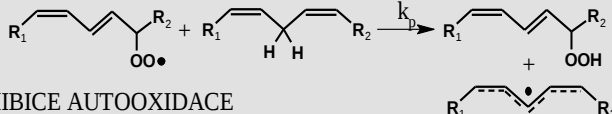
INICIACE:

a) 

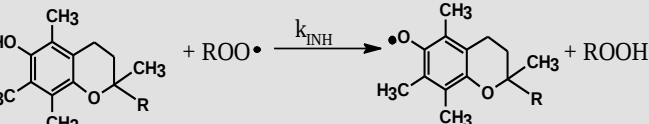
b) 

PROPAGACE:

c) 

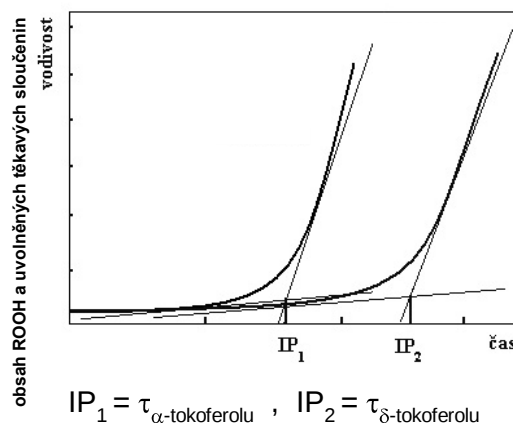
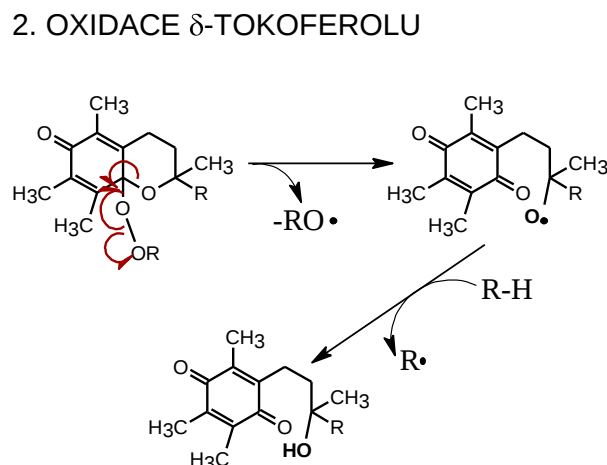
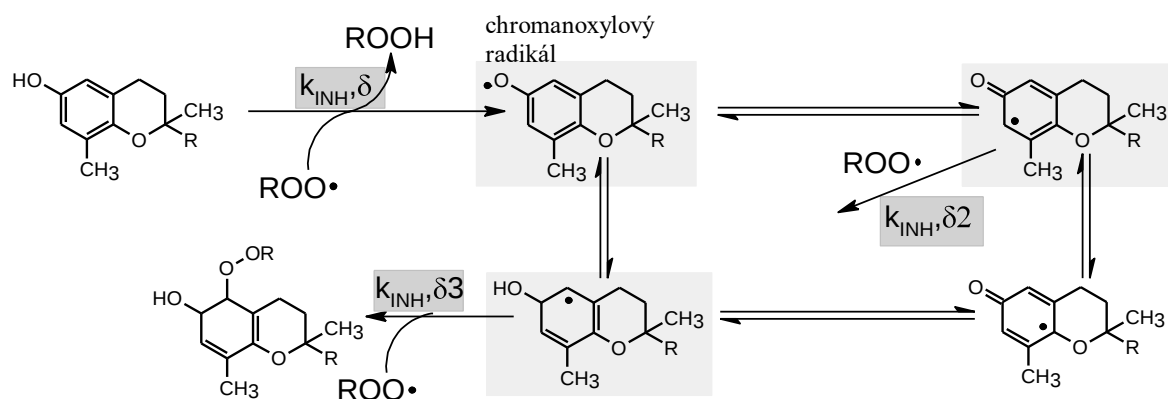
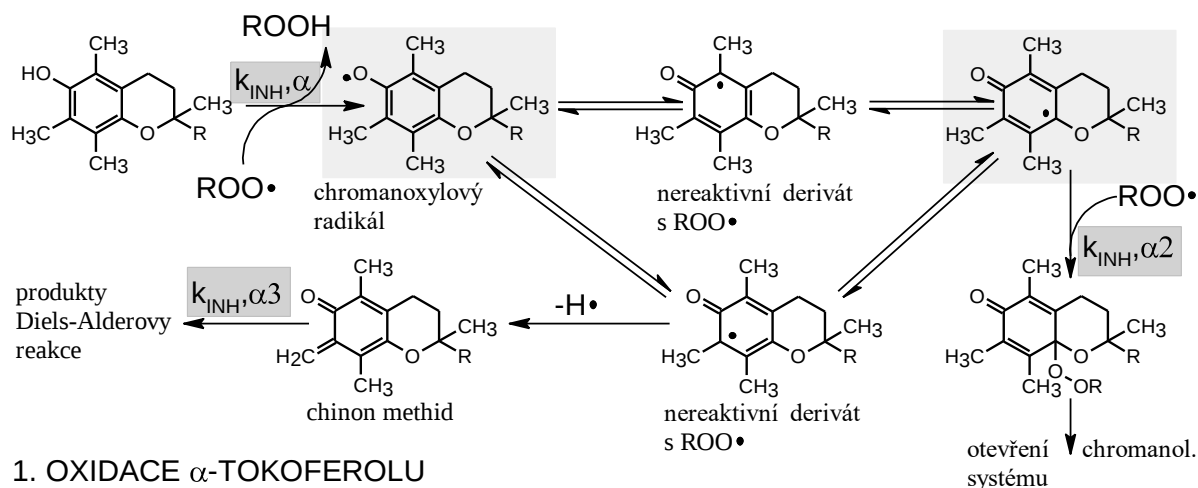
d) 

INHIBICE AUTOOXIDACE ANTIOXIDANTY (TOKOFEROLY):

e) 

Vznikající fenoxyllové (aryloxylové) radikály musí být dostatečně stabilní, aby se neúčastnily propagační fáze. Důležitá podmínka je splněna díky delokalizaci nepárového elektronu fenoxyllového radikálu v aromatickém systému. Stabilizace delokalizací je dána povahou substituentů vázaných na aromatický systém<sup>9,45</sup>. Tokoferoly a tokotrienoly jsou lipofilní inhibitory autooxidace rostlinného původu. Při reakci tokochromanolového systému

s prvním molem allylového ( $R\cdot$ ), bis-allylového ( $R\cdot$ ), alkoxylového ( $RO\cdot$ ) či alkylperoxylového radikálu ( $ROO\cdot$ ) vzniká rezonančně stabilizovaný chromanoxylový radikál. K delokalizaci nepárového elektronu dochází v *ortho* a *para* pozici (obr. 24).



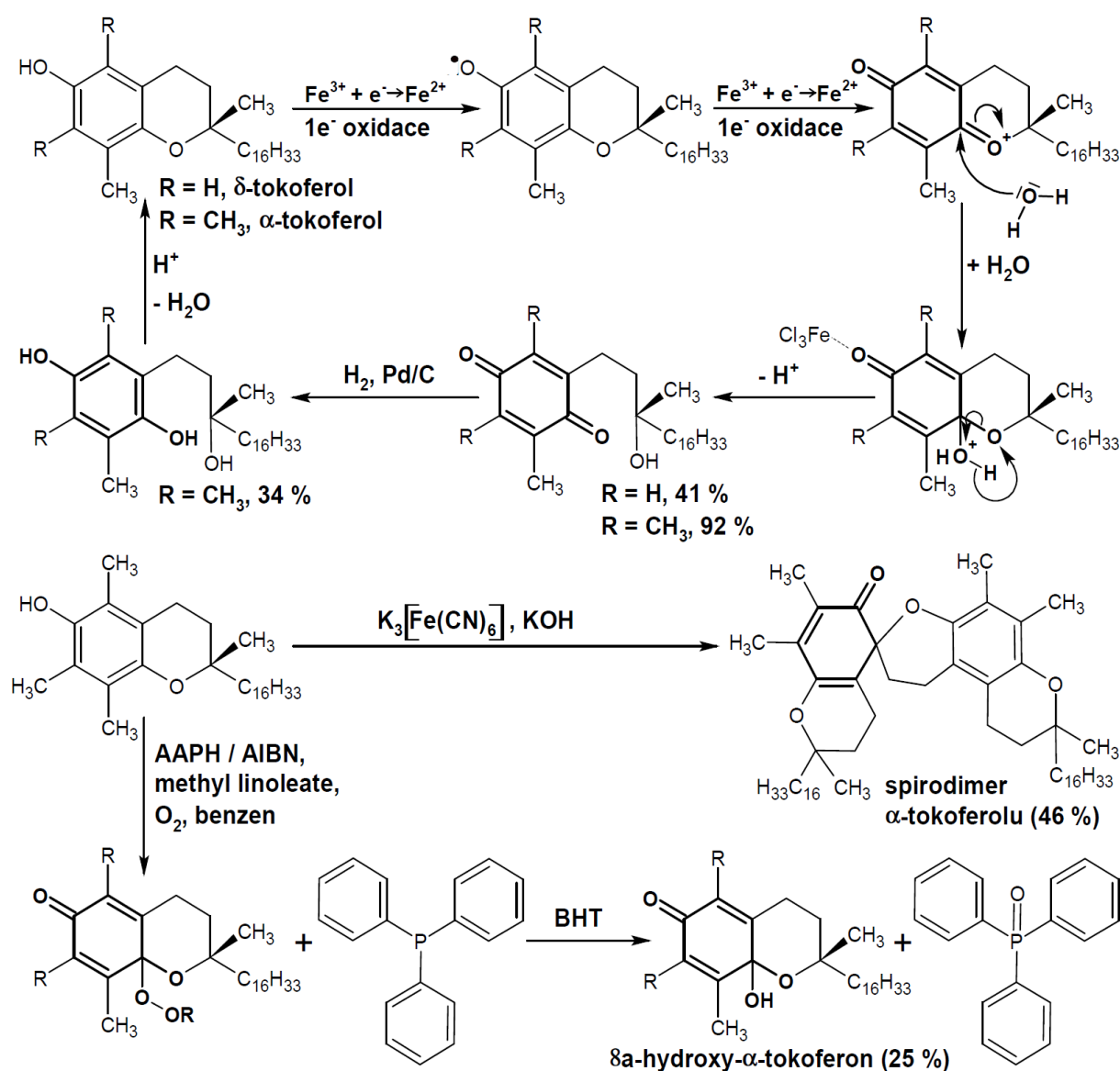
### 3. MECHANISMUS VZNIKU $\alpha$ -TOKOFEROCHINONU: prooxidační účinky tokoferolů

**Obr. 24** Rozdílná reaktivita derivátů  $\alpha$ -,  $\delta$ -tokoferolu při inhibici autooxidace a současné prooxidační účinky při transformaci derivátu  $\alpha$ -tokoferonu na  $\alpha$ -tokoferochinon.

Chromanoxylový radikál vzniká nejsnáze z  $\alpha$ -tokoferolu, neboť disociační entalpie vazby O-H a ionizační potenciál jsou nejnižší<sup>9,45</sup>. Další adice volných radikálů  $RO\bullet$ ,  $ROO\bullet$  je orientována do *ortho* a *para* polohy. Rychlost druhé adice není v literatuře uvedena a zcela jistě je ovlivněna sterickým bráněním. Substituenty v *ortho* a *para* poloze rozhodujícím způsobem limitují celkový antioxidační účinek tokochromanolového systému (obr. 22). Proto je nejvíce substituovaný  $\alpha$ -tokoferol navzdory nejvyšší hodnotě  $k_{INH}$ , derivátem tokoferolu s nejnižším antioxidačním účinkem<sup>46,47</sup>. V případě  $\delta$ -tokoferolu pravděpodobně nedochází k otevření chromanového cyklu a podle dostupné literatury se snáze vytváří dimerní sloučeniny. Vznikají terminací radikálů nebo pericyklickými reakcemi. Derivát  $\alpha$ -tokoferonu se homolytickou transformací převádí na  $\alpha$ -tokoferochinon za současného vzniku dvou radikálů (alkoxylového a alkylového), které propagují autooxidaci lipidů v časovém intervalu za indukční periodou systému<sup>46,47</sup>. Antioxidanty s heteroatomy (kyslík, síra, selen, dusík) v *p*-poloze vykazují obecně vyšší antioxidační účinky, důvodem je další možnost rezonanční stabilizace, kterou způsobují volné elektronové páry heteroatomů – nejčastěji etherově vázaného kyslíku se dvěma volnými elektronovými páry. Uvedená stabilizace vysvětluje vyšší antioxidační účinek BHA oproti BHT s methylovou skupinou v *p*-poloze<sup>46,47</sup>.

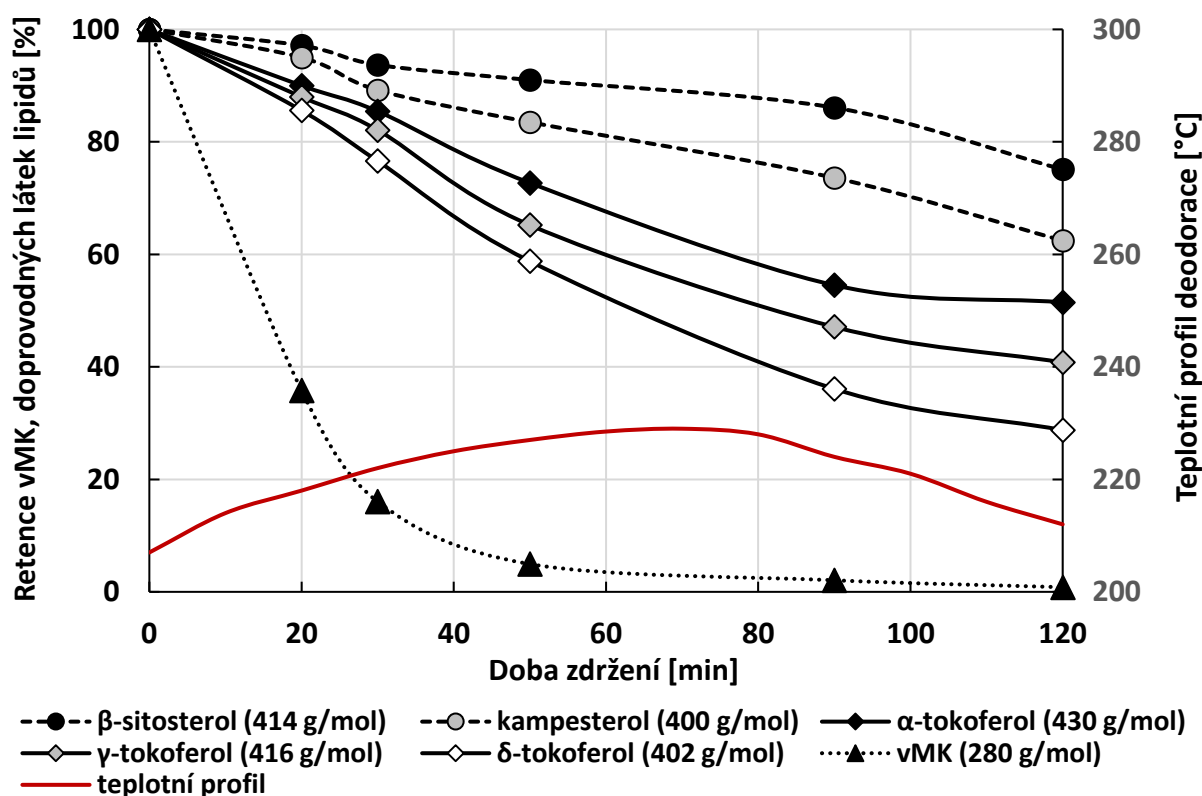
Tokochromanoly jsou nejdůležitějšími lipofilními antioxidanty v živých systémech i potravinových výrobcích. Při kulinárních úpravách jako je pečení, smažení, fritování či mikrovlnný ohřev jsou transformovány na různě substituované *p*-chinony<sup>5,6</sup>. Jestliže jsou tokochromanoly zcela vyčerpány, systém dospěje do zlomového bodu – indukční periody, poté dochází ke zdánlivě exponenciálnímu růstu vznikajících alkylhydroperoxidů. V reálném systému (potravině) ale postupně roste pravděpodobnost, že radikál ( $R\bullet$ ,  $RO\bullet$ ,  $ROO\bullet$ ) zreaguje při terminaci s dalším radikálem, skutečný průběh tedy znázorňuje logistická křivka. Analogickým způsobem vznikají v ovoci *o*-chinony odvozené od polyfenolů (fenolové kyseliny, flavonoidy, tanniny) poté, co je kvantitativně spotřebován askorbát v pletivech. Elektrofilní *o*- a *p*-chinony jsou dle stupně substituce vysoce reaktivní sloučeniny, které reagují s nukleofilními donory podobně jako  $\alpha,\beta$ -nenasycené aldehydy (kap. 2.1, str. 9). Cytotoxicita  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferochinonů je připisována vzniku Michaelových aduktů s tzv. sekrečními proteiny, což zcela znemožňuje jejich posttranslační modifikace či vznik funkční prostorové struktury. Zcela substituovaný  $\alpha$ -tokoferochinon nepodléhá konjugované adici, proto se nabízí otázka, zda výsadní zastoupení  $\alpha$ -tokoferolu a jeho chinonu v živočišných buňkách není ve skutečnosti evoluční výhodou. Degradace  $\alpha$ -tokoferolu při chemické a fyzikální rafinaci není prozkoumána, proto jsme se rozhodli syntetizovat klíčové produkty oxidace tokochromanolů (obr. 25) pro potřebu vývoje analytické koncovky (HPLC-UV,

DART TOF-MS) a pro následné kinetické experimenty. Tokoferochinony byly připraveny dvouelektronovou oxidací pomocí  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , přičemž k reakci byly zapotřebí alespoň 3 ekvivalenty činidla, neboť třetí ekvivalent sloužil jako Lewisova kyselina při hydrataci tokoferoxylového kationtu. Spirodimer  $\alpha$ -tokoferolu byl připraven reakcí s ferrikyanidem draselným, syntéza 8a-hydroxy- $\alpha$ -tokoferonu byla iniciována radikály v prostředí methyl linoleátu. Vznikly derivát 8a-hydroperoxy- $\alpha$ -tokoferonu byl následně specificky redukován trifenyfosfinem či triethylfosfitem<sup>5,6</sup>.



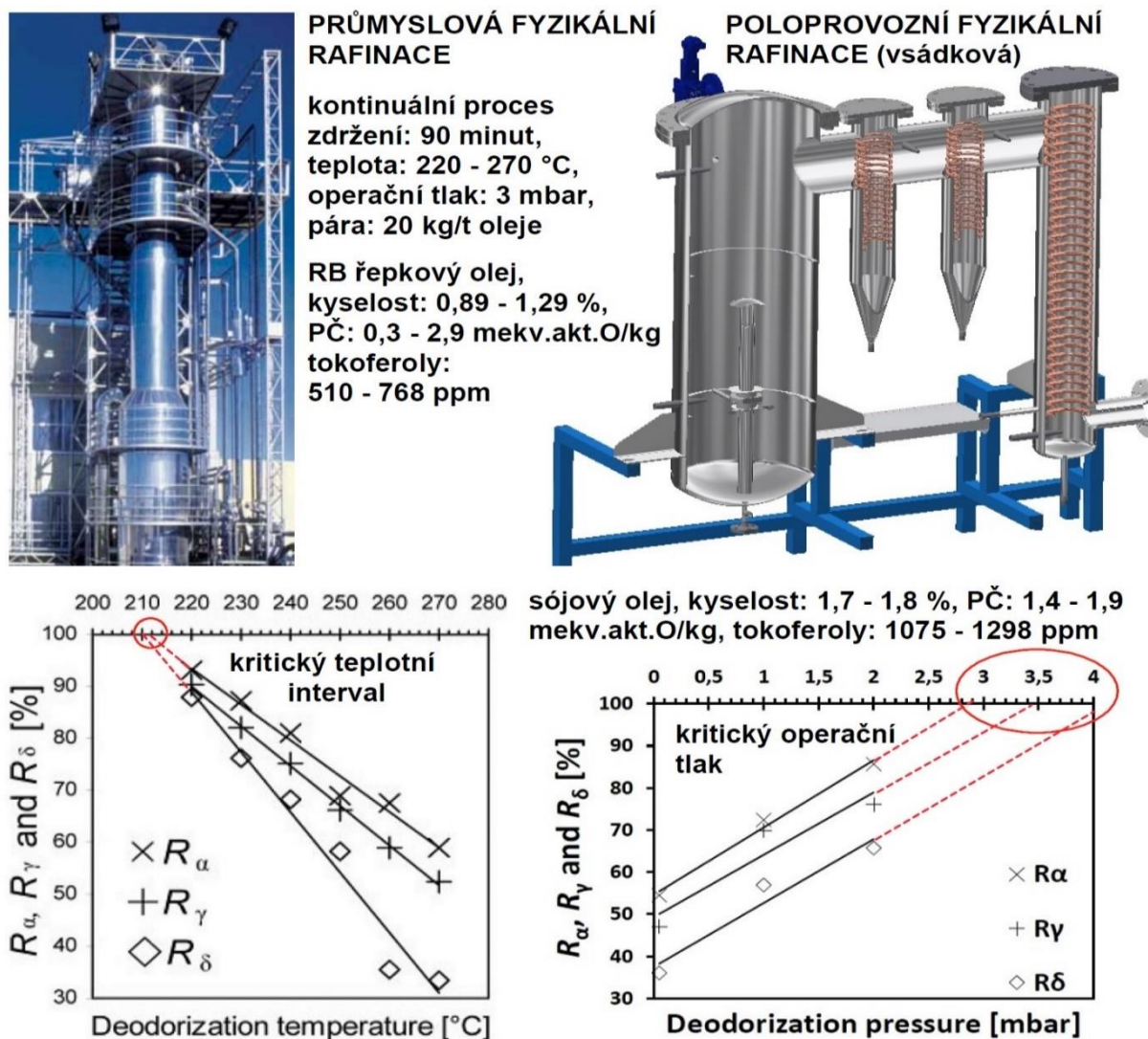
**Obr. 25** Syntéza  $\alpha$ -tokoferochinonu,  $\delta$ -tokoferochinonu, 8a-hydroxy- $\alpha$ -tokoferonu a spirodimerů  $\alpha$ -tokoferolu.

V průmyslovém měřítku nelze vyloučit ztráty tokoferolů a tokotrienolů rafinací, s ohledem na fyzikálně-chemické vlastnosti se je snažíme alespoň minimalizovat. Způsob jakým jsou technologicky odstraněny volné mastné kyseliny, jednoznačně definuje kvalitu destilátu v závěrečném stupni rafinace jedlých olejů. V USA dominuje použití chemické rafinace při zpracování surového sójového oleje, deodorací jsou tudíž odstraněny pachové látky a také značná část tokoferolů či fytosterolů ( $\approx 25\%$ ). Pro americké výrobce je důležitým obchodovatelným parametrem nejen obsah tokochromanolů v rafinovaném oleji (min. 500 mg/kg), ale také v deodoračním kondenzátu, neboť ten je účelně využit farmaceutickými společnostmi jako cenný zdroj vitamínu E, skvalenu či fytosterolů (300 – 700 \$/ tunu). Cenu destilátu determinuje pouze obsah biologicky aktivních sloučenin, zejména  $\alpha$ -tokoferolu, nejúčinnějšího vitamínu. Příčinou deodoračních ztrát je neúčinná kondenzace par za hlubokého vakua, která vede ke stripování tokochromanolů s přehřátou parou do destilátu. Zcela zásadní vliv na retenci tokoferolů má dosažené vakuum, teplota, doba zdržení, způsob distribuce a stripování přehřáté páry (mamutkami/tryskami). V Evropské unii převládá fyzikální rafinace, výjimkou jsou výrobci biopaliv, zde je ekonomicky výhodné alkalicky neutralizovat vMK. V jedlých olejích po fyzikální rafinaci je retence tokoferolů vyšší (800 – 1000 mg/kg), destilát představují mastné kyseliny s využitím v oleochemickém sektoru<sup>48</sup>.



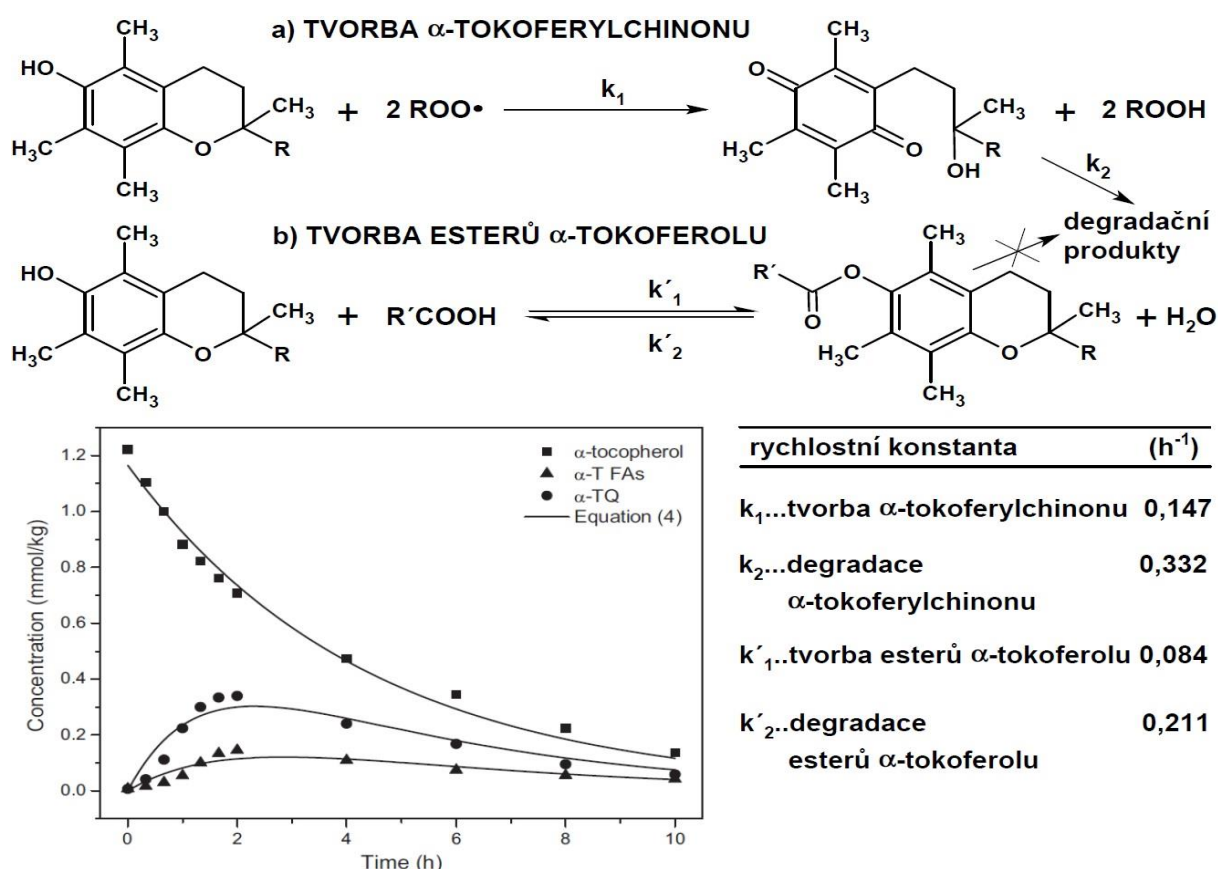
Obr. 26 Vliv molekulové hmotnosti na retenci tokoferolů, fytosterolů a mstných kyselin<sup>48</sup>.

Protože ve většině olejů s vysokým zastoupením polynenasycených mastných kyselin dominuje  $\gamma$ -tokoferol (50 – 80 %), rozhodli jsme se ve spolupráci s firmou Farnet a.s. modelovat vliv molekulové hmotnosti doprovodných látek lipidů na jejich retenci v olejích (obr. 26). Podmínky fyzikální rafinace byly simulovány na poloprovozním šaržovém zařízení (obr. 27, vpravo) s mamutkou. K odkyselení byl vybrán sójový olej v RB kvalitě (obsah vMK: 1,7 – 1,8 %; PČ: 1,4 – 1,6 mekv. akt.O/kg; tokoferoly: 1075 – 1298 mg/kg) od firmy ADM Mainz GmbH. Experiment simuloval průmyslové podmínky (vsádka: 80 kg; zdržení: 120 minut; tlak: 0,05 mbar; pára: 20 kg/t; průměrná teplota: 220 °C) s velmi hlubokým vakuem, příčinou byly extrémní ztráty tokochromanolů, jejich retence klesala v pořadí  $R_\alpha > R_\gamma > R_\delta$ . Ztráty fytosterolů nepřekročily 40 %, obsah vMK byl po 50 minutách experimentu pod 0,1 %.



**Obr. 27** Vliv kontinuálního průmyslového odkyselování a vsádkové fyzikální rafinace v poloprovozním měřítku na retenci  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokoferolů<sup>48,49</sup>.

Retence jednotlivých tokoferolů byla přímo úměrná molekulové hmotnosti, ke stejným závěrům dospěl autorský kolektiv doc. Čmolíka na průmyslové koloně ve firmě Setuza a.s. (dnes Glencore Grain Czech s.r.o.)<sup>49</sup>. V obou studiích byla data normalizována, proložena a extrapolována, cílem bylo jednoduché určení kritického teplotního a tlakového intervalu (obr. 27)<sup>48,49</sup>. V původní časopisecké literatuře autoři používají moderní regresní metody s interakcí veličin, např. response surface methodology, jejich závěry jsou však jen obtížně přenositelné do průmyslové praxe<sup>48,49</sup>. Stripování tokochromanolů s přehřátou parou není jedinou příčinou úbytku, průmyslové aparáty nejsou zcela těsné a průnik vzduchu z okolí vede k tvorbě cytotoxických tokoferochinonů. Degradční produkty antioxidantů lze považovat za spolehlivé indikátory správně provedeného deodoračního procesu. Ve spolupráci se skupinou doc. Krepse z STU Bratislava jsme vyvrátili vznik spirodimerů tokoferolů, naopak byly identifikovány nové procesní kontaminanty – estery tokoferolů (obr. 28), které vznikají kyselé katalyzovanou esterifikací v průběhu fyzikální rafinace<sup>5,6</sup>. Méně substituované deriváty vitamínu E jsou za vysokých teplot esterifikovány snáze (70 – 128 mg/kg).



**Obr. 28** Vliv fyzikální rafinace na tvorbu  $\alpha$ -tokoferochinonu díky netěsnostem aparatury a esterů  $\alpha$ -tokoferolu při autokatalyzované Fischerově esterifikaci.

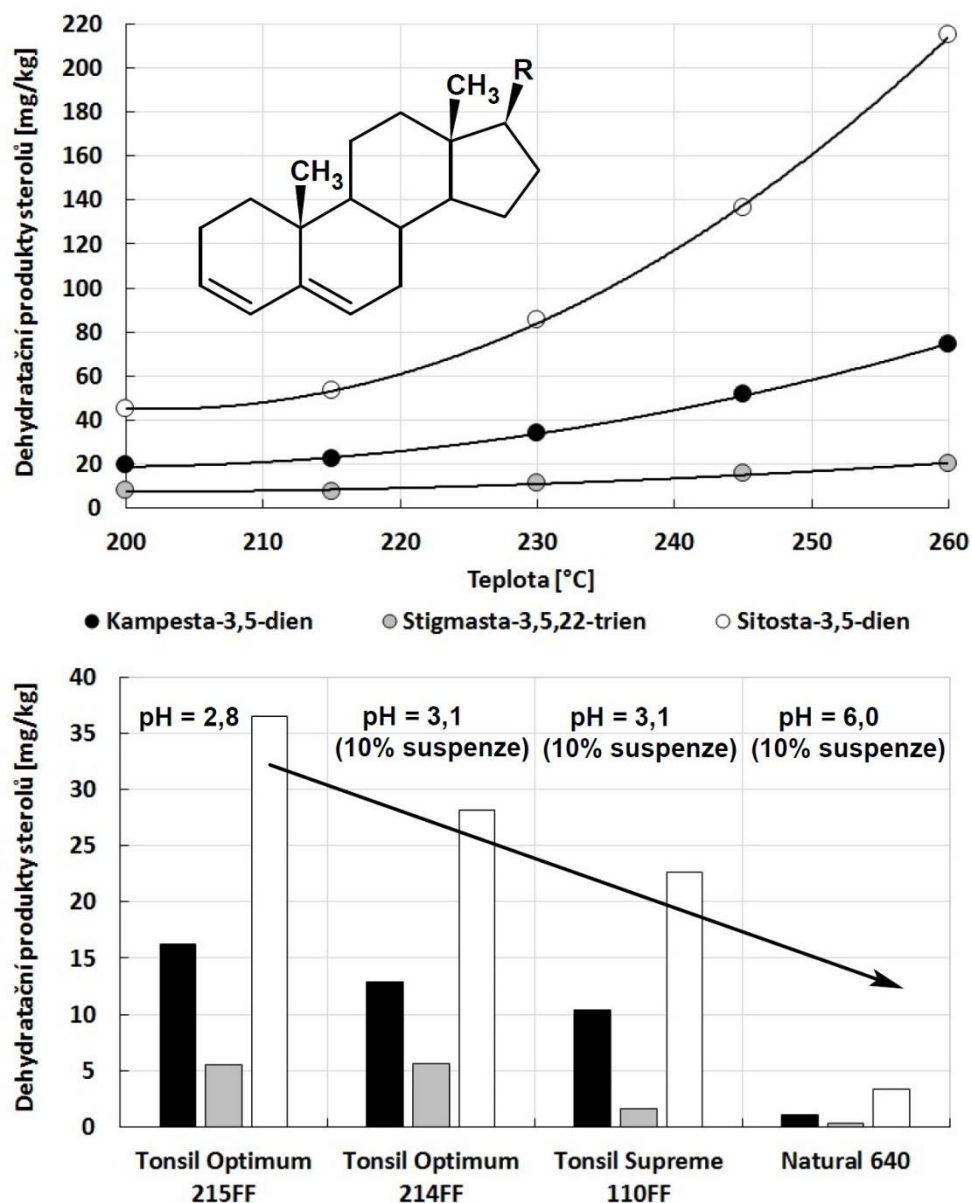
## 2.5. Vliv rafinace a chemické modifikace na obsah volných a vázaných fytosterolů a jejich degradačních produktů

Rostlinné oleje jsou významným zdrojem volných a esterově vázaných fytosterolů, jejich konečný obsah je ovlivněn rafinací, chemickými, enzymovými i fyzikálními modifikacemi a také skladovacími podmínkami. Při chemické rafinaci jsou obvyklé ztráty volných fytosterolů 25 %<sup>50</sup>. Při alkalické neutralizaci sójového oleje jsou volné steroly strženy společně s mýdly do „soapstocku“, neutralizace volných mastných kyselin 2,5% roztokem NaOH způsobuje největší ztráty celkových fytosterolů z 3479 na 2641 mg/kg, tedy o 31,8 %. S vyšší koncentrací NaOH (7,5 – 12,5%) vzrůstá retence složek nezmýdelnitelného podílu v oleji<sup>51</sup>.

Při adsorpčním bělení rostlinných olejů kyselé aktivovanou bělicí hlinkou (80 – 120 °C, 30 – 60 min, 1 – 2 hm. %) probíhají izomerační reakce v postranním řetězci a především dehydratační reakce za vzniku tzv. stera-3,5-dienů a stera-3,5,22-trienů s konjugovaným systémem dvojných vazeb, zvláště stigmasta-3,5-dienu (3,7 – 102,7 mg/kg); stigmasta-3,5,22-trienu (1,2 – 19,7 mg/kg) a kampesta-3,5-dienu (3,1 – 46,9 mg/kg). Analogické sloučeniny vznikají také z oxidačních produktů fytosterolů (stigmasta-2,4,6-trien, stigmasta-2,4,6,22-tetraen)<sup>52,53</sup>. V souladu s International Olive Council (IOC) je praktická absence stigmasta-3,5-dienu jedním ze základních obchodovatelných parametrů (Trade Standards; COI/T.20/Doc. No 11/Rev.3 2017) extra panenských ( $\leq 0,05$  mg/kg), panenských ( $\leq 0,10$  mg/kg) a lampante ( $\leq 0,50$  mg/kg) olivových olejů<sup>52</sup>. Obsah steroidních uhlovodíků v ostatních surových olejích získaných lisováním či rozpouštědlovou extrakcí nepřesahuje 0,01 mg/kg, další jednotkové operace způsobují eliminační reakce fytosterolů. V průmyslu se nejčastěji používají hlinitokřemičitany aktivované kyselinou chlorovodíkovou o pH (10% suspenze)  $\approx 3$  (Tonsil® Optimum 210FF, Tonsil® Supreme), které mají velký měrný povrch (230 – 330 m<sup>2</sup>/g). Výsledkem kombinované fyzikální sorpce a chemisorpce je odstranění chlorofylů, fosforu (0,4 – 2,5 mg/kg) a Fe (0,5 – 1,0 mg/kg)<sup>52</sup>. Použití neutrálních bělicích hlinek umožňuje řádové snížení obsahu vzniklých stera-3,5-dienů (obr. 29, spodní), jedná se však o kompromis vykoupený sníženou velikostí měrného povrchu (140 – 170 m<sup>2</sup>/g) a sorpčními schopnostmi.

Posledním krokem chemické rafinace je deodorace, hlavním cílem je odstranění pachových sloučenin destilací s přehřátou vodní parou za hlubokého vakua (1 – 3 hPa). Při deodoraci sójového oleje jsou typické ztráty volného  $\beta$ -sitosterolu 18 %, deodorační

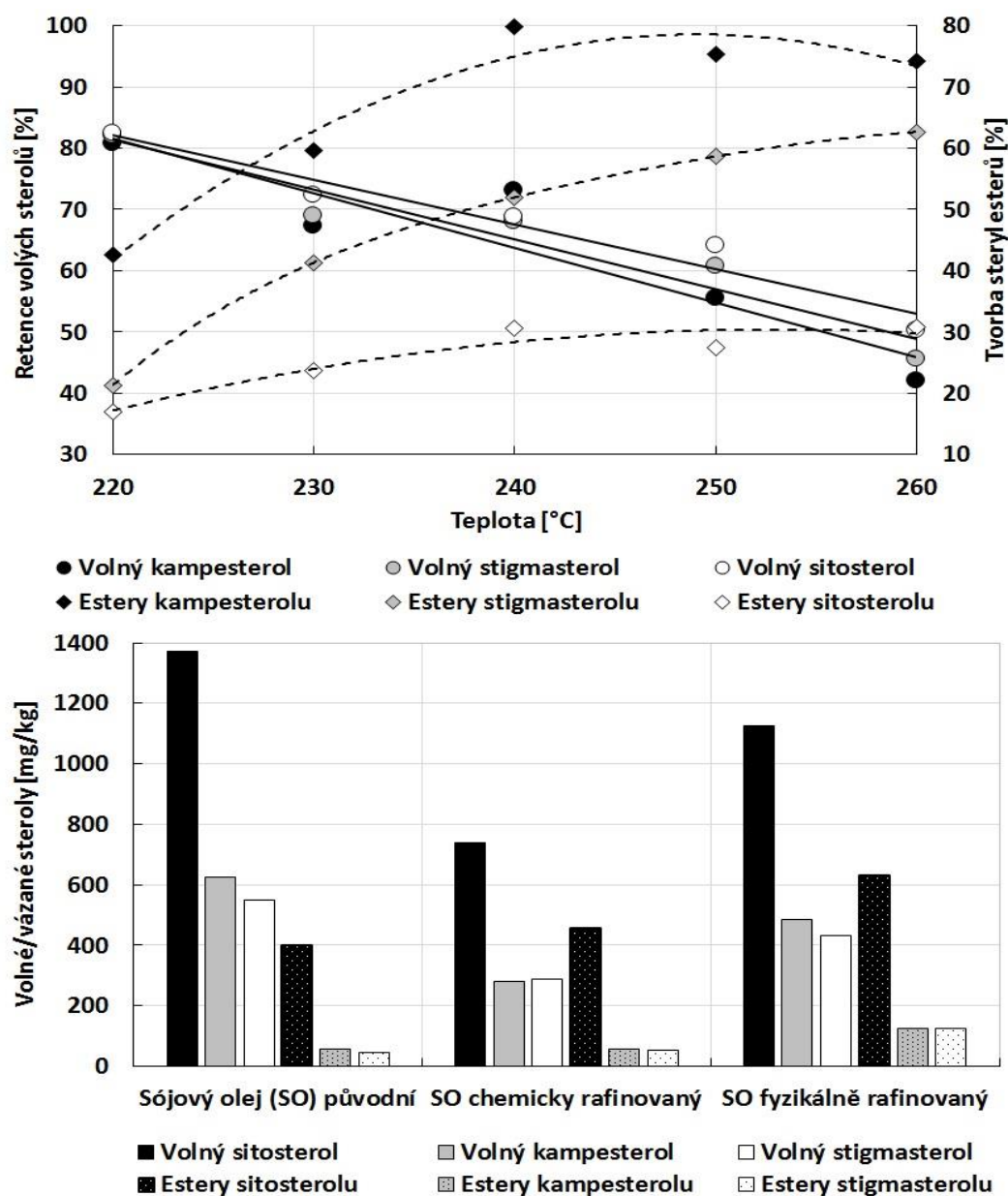
kondenzát je tudíž dobrým zdrojem sterolů, ale také skvalenu a tokoferolů. Estery fytosterolů v olejích po uplatnění alkalické neutralizace nevznikají.



**Obr. 29** Vliv podmínek adsorpčního bělení a deodorace na tvorbu stera-3,5-dienů<sup>52</sup>.

Při fyzikální rafinaci je klíčový závěrečný odkyselovací stupeň, zde jsou oddestilovány vMK a dochází k vysokoteplotnímu bělení, tedy chemické degradaci karotenů. Deacidifikace je kritickou fází rafinace, neboť drastické podmínky procesu umožňují vznik procesních kontaminantů (*trans* mastné kyseliny, dimery a cyklické MK, estery 3-MCPD a glycidolu). Celkové ztráty volných fytosterolů jsou úměrné stripování do destilátu volných mastných kyselin a také kyselé katalyzovaným eliminačním (obr. 29, vrchní) a esterifikačním reakcím. Mezi destilovanými vMK se hromadí nejen volné steroly, ale také stera-3,5-dieny

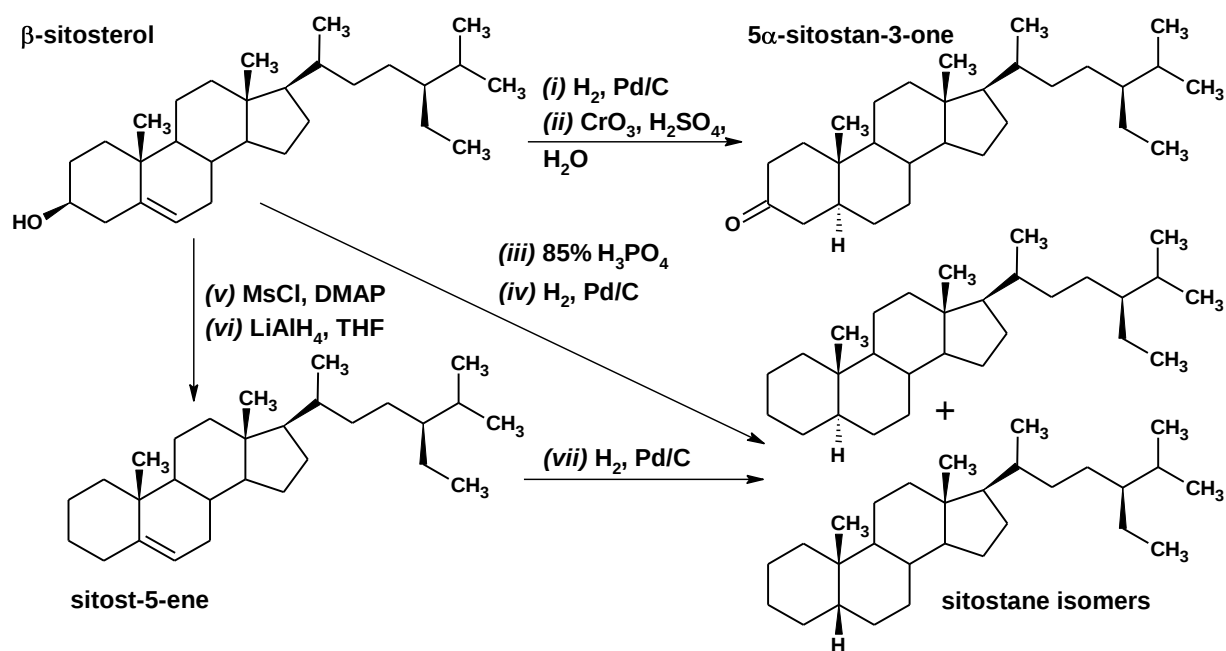
s  $M_w = 382 - 398$  g/mol, s ohledem na molekulovou hmotnost steryl esterů ( $M_w = 640 - 680$  g/mol) je přestřík do destilátu téměř vyloučen. V teplotním intervalu  $220 - 260$  °C jsou ztráty steroidních uhlovodíků při odkyselování od 20 do 56 %<sup>52</sup>. I přesto lze fyzikální rafinaci považovat za šetrnější technologii s vyšší retencí doprovodných látek lipidů v porovnání s chemickou rafinací a koncovou deodorací (obr. 30), neboť obsah volných fytosterolů/tokoferolů/tokotrienolů v plně rafinovaném oleji je vyšší (obr. 30) a současně se zvyšuje obsah steryl, tokoferyl a tokotrienyl esterů. Příslušné estery neztrácejí biologickou aktivitu a současně jsou výrazně oxidačně stabilnější než jejich volné formy.



**Obr. 30** Vliv deodorace a fyzikální rafinace na tvorbu esterů fytosterolů a stripování volných rostlinných sterolů<sup>52</sup>.

Vliv chemické modifikace triacylglycerolů na změny fytosterolové frakce nebyl doposud detailně studován. Azadmard-Damirchi a Dutta zkoumali vliv chemické interesterifikace (120 °C, katalyzátor CH<sub>3</sub>ONa) na zastoupení volných a vázaných fytosterolů a tokochromanolů, za podmínek randomizace byl zvýšen obsah esterů fytosterolů o 7 %, současně byl snížen obsah  $\delta$ -tokotrienolu o 35 %. Závěrem lze říci, že frakce volných a vázaných fytosterolů jsou ovlivněny zvolenou rafinační a modifikační technologií. Proto je s podivem, že změny fytosterolů za podmínek totální hydrogenace nebyly prozkoumány, neboť se jedná o jediný proces, který ovlivňuje strukturu veškerých steroidních sloučenin<sup>50</sup>.

Identifikace nových degradačních produktů fytosterolů po hydrogenaci byla provedena srovnáním retenčních charakteristik, EI-MS, APCI-MS a <sup>13</sup>C-NMR spekter izolovaných a syntetizovaných sloučenin. Při syntéze 5 $\alpha$ -sitostan-3-onu, 5 $\alpha$ -kampestan-3-onu, stereoisomerů 5 $\alpha$ /5 $\beta$ -steranů, sitost-5-enu a kampest-5-enu byla uplatněna (obr. 31) hydrogenace (i,iv,vii), Jonesova oxidace (ii), dehydratace (iii), mesylace (v) a hydrogenolýza mesylátu (vi)<sup>54</sup>.



**Obr. 31** Syntéza analytických standard degradačních produktů  $\beta$ -sitosterolu<sup>54</sup>.

Detailní strukturní analýza potvrdila přítomnost 3-oxo derivátů fytosterolů, jmenovitě sitostan-3-onu (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O) a kampestan-3-onu (C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O). Hmotnostně-spektrometrické techniky prokázaly přítomnost intenzivního molekulárního iontu, v případě elektronové ionizace se jednalo o hmoty 414 *m/z* (derivát  $\beta$ -sitosterolu) and 400 *m/z* (derivát kampesterolu), při použití „měkké“ ionizační techniky APCI-MS (pozitivní mód) byly ve spektrech průkazné následující kladné ionty 415.39307 *m/z* [M+H]<sup>+</sup> a 401.37784

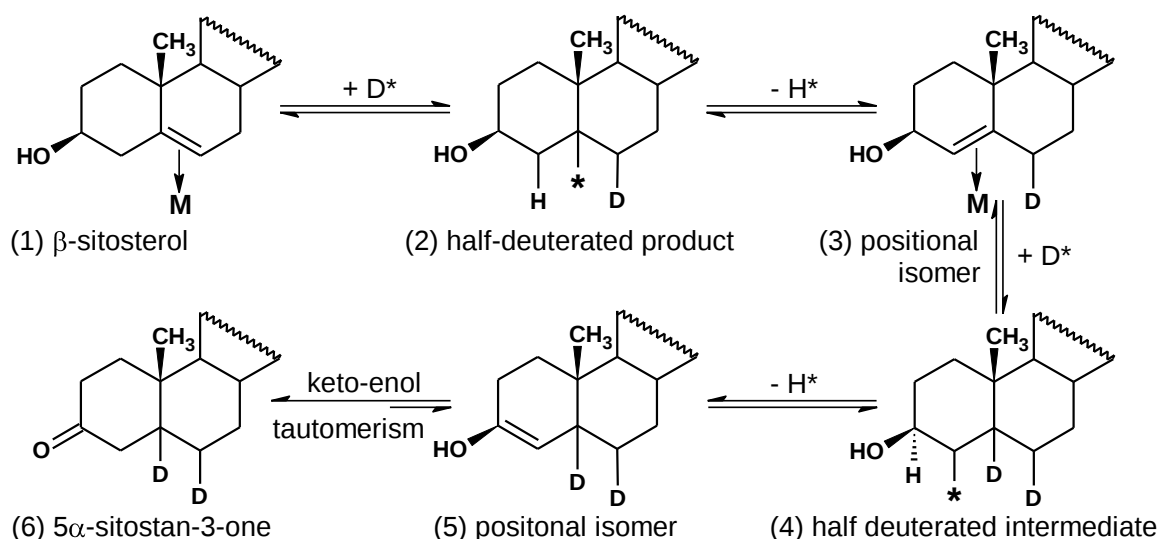
$m/z$   $[M+H]^+$ . Technika EI-MS byla uplatněna při identifikaci jednotlivých stereoizomerů 3-oxostanonů a také steroidních uhlovodíků. Absence fragmentů, které vznikají  $\sigma$ -štěpením kruhu A rozličných  $5\beta$ -3-oxosteroidů, prokázala selektivní tvorbu  $5\alpha$ -sitostan-3-onu a  $5\alpha$ -kampestan-3-onu. V případě plně nasycených steroidních uhlovodíků byly identifikovány jednotlivé stereoisomery na základě selektivní fragmentace kruhu C a D (hmoty 149 a 151  $m/z$ ). Při strukturní analýze série mononenasycených sterenů byla aplikována technika  $^{13}\text{C}$  NMR. V APT spektrech se jednalo zejména o posuny  $\delta$  145.21 a 143.75 ppm, které byly přiřazeny uhlíku C-5 v molekulách sitost-4-enu a sitost-5-enu. Intenzivní signály u 125.52, 118.99 a 118.91 ppm náležely methinovým uhlíkům sitost-3-enu (C-3), sitost-5-enu (C-6) a sitost-4-enu (C-4). Následně byla potvrzena přítomnost nových degradačních produktů fytosterolů v komerčních vzorcích plně hydrogenovaného řepkového (IV 0,77 - 1,53 g  $\text{I}_2/100$  g), sójového (IV 0,23 - 1,11 g  $\text{I}_2/100$  g), slunečnicového (IV 0,27 - 0,65 g  $\text{I}_2/100$  g), palmového (IV 0,29 - 1,19 g  $\text{I}_2/100$  g) a kokosového oleje (IV 0,01 - 0,02 g  $\text{I}_2/100$  g) (Tab. III). Ve všech vzorcích byl detekován degradační produkt  $\beta$ -sitosterolu ( $5\alpha$ -sitostan-3-on), s největším obsahem v sójovém (77,7 – 192,4 mg/kg) a slunečnicovém oleji (74,1 – 172,3 mg/kg). Degradační produkt kampesterolu ( $5\alpha$ -kampestan-3-on) nebyl detekován v palmovém oleji a kokosovém tuku, což je dáno nízkým počátečním obsahem fytosterolů u původních komodit. Konečné degradační produkty,  $5\alpha/5\beta$ -stigmastan a  $5\alpha/5\beta$ -kampestan, byly detekovány ve všech vzorcích, dominantní formou byl termodynamicky stabilnější  $5\alpha$  izomer.

**Tabulka III** Degradační produkty fytosterolů v komerčních plně hydrogenovaných vzorcích

| Charakteristika                   | Řepkový olej  | Sójový olej   | Slunečnicový olej | Palmový olej    |
|-----------------------------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|
| Index lomu $n_D^{70}$             | 1,4420-1,4421 | 1,4430-1,4432 | 1,4432-1,4451     | 1,4421-1,4422   |
| Jodové číslo g $\text{I}_2/100$ g | 0,77-1,53     | 0,23-1,11     | 0,27-0,65         | 0,29-1,10       |
| <i>trans</i> -UFA* g/100 g        | 0,67-1,46     | 0,12-1,09     | 0,28-0,57         | 0,13-0,90       |
| Fytosteroly                       | 2393-2419     | 1748-1903     | 942-1520          | 217-258         |
| Fytostanoly                       | 1028-1338     | 450-973       | 522-786           | 62-139          |
| $5\alpha$ -Stigmastan             | 113,4-276,0   | 52,6-197,6    | 219,0-253,2       | 24,8-31,9       |
| $5\beta$ -Stigmastan              | 108,7-171,3   | 32,7-121,9    | 169,0-208,7       | 16,6-21,6       |
| Stigmasteny <sup>†</sup> mg/kg    | 55,5-120,2    | 91,4-99,5     | 30,2-52,3         | 8,8-11,0        |
| $5\alpha$ -Kampestan              | 93,0-262,3    | 36,9-156,2    | 43,0-171,9        | 10,5-14,2       |
| $5\beta$ -Kampestan               | 86,8-134,9    | 5,7-89,7      | 29,9-90,7         | 8,0-9,3         |
| Kampesteny <sup>‡</sup>           | 40,2-109,3    | 24,9-62,1     | 13,4-73,0         | 5,0-6,1         |
| $5\alpha$ -Sitostan-3-on          | 68,4-160,1    | 77,7-192,4    | 74,1-172,3        | 4,2-7,4         |
| $5\alpha$ -Kampestan-3-on         | 56,3-117,7    | 24,9-85,7     | 32,7-100,5        | ND <sup>§</sup> |

\*UFA, nenasyčené mastné kyseliny, <sup>†</sup>Suma polohových izomerů stigmastenu, <sup>‡</sup>Suma polohových izomerů kampestanu, <sup>§</sup>ND, nebylo detekováno

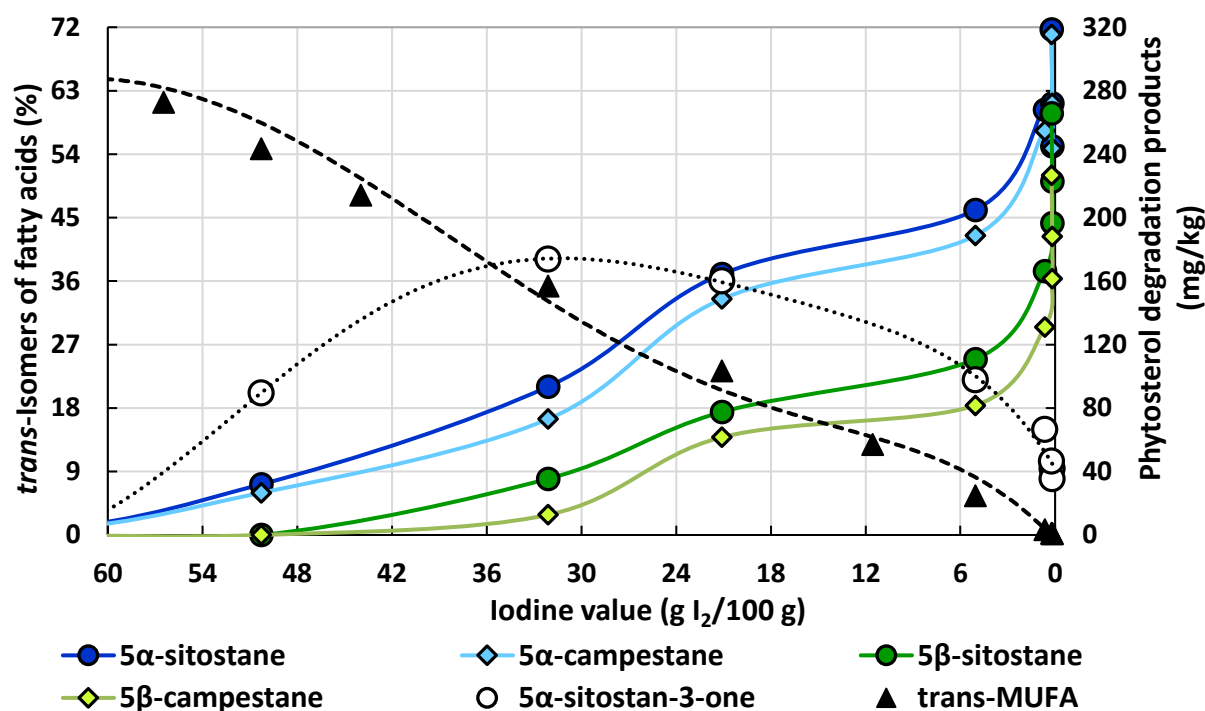
Provedená transferhydrogenace  $\beta$ -sitosterolu s donory deuteria ( $\text{DCOONa}$ ) prokázala pravděpodobný mechanismus vzniku degradačních produktů fytosterolů. Reakce molekuly  $\text{H}_2$  s povrchem katalyzátoru probíhá totožným mechanismem disociativní adsorpce (obr. 32) za vzniku adsorbovaného atomárního vodíku  $\text{H}^*$  či deuteria  $\text{D}^*$ . Po dosažení molekuly fytosterolu povrchu kovového katalyzátoru dochází k adsorpci dvojné vazby v poloze C5. Při navázání deuteria vzniká částečně deuterovaný meziprodukt s nutnou změnou hybridizace (alkyl), následuje migrace dvojné vazby do polohy C4. Nově vytvořená dvojná vazba opět interaguje s povrchem kovového katalyzátoru. Dochází ke kovalentní vazbě dalšího atomu deuteria a opětovné migraci dvojné vazby do polohy C3. V závěru může docházet, a při vzniku  $5\alpha$ -stigmastan-3-onu skutečně dochází, k keto-enol tautomerii za vzniku karbonylového skupiny v poloze C3. Při vzniku derivátů stigmastenu předchází migraci dvojné vazby eliminace sekundární OH skupiny na uhlíku C3, což bylo potvrzeno metodami APCI-MS a EI-MS přítomností konjugovaných stera-3,5-dienů.



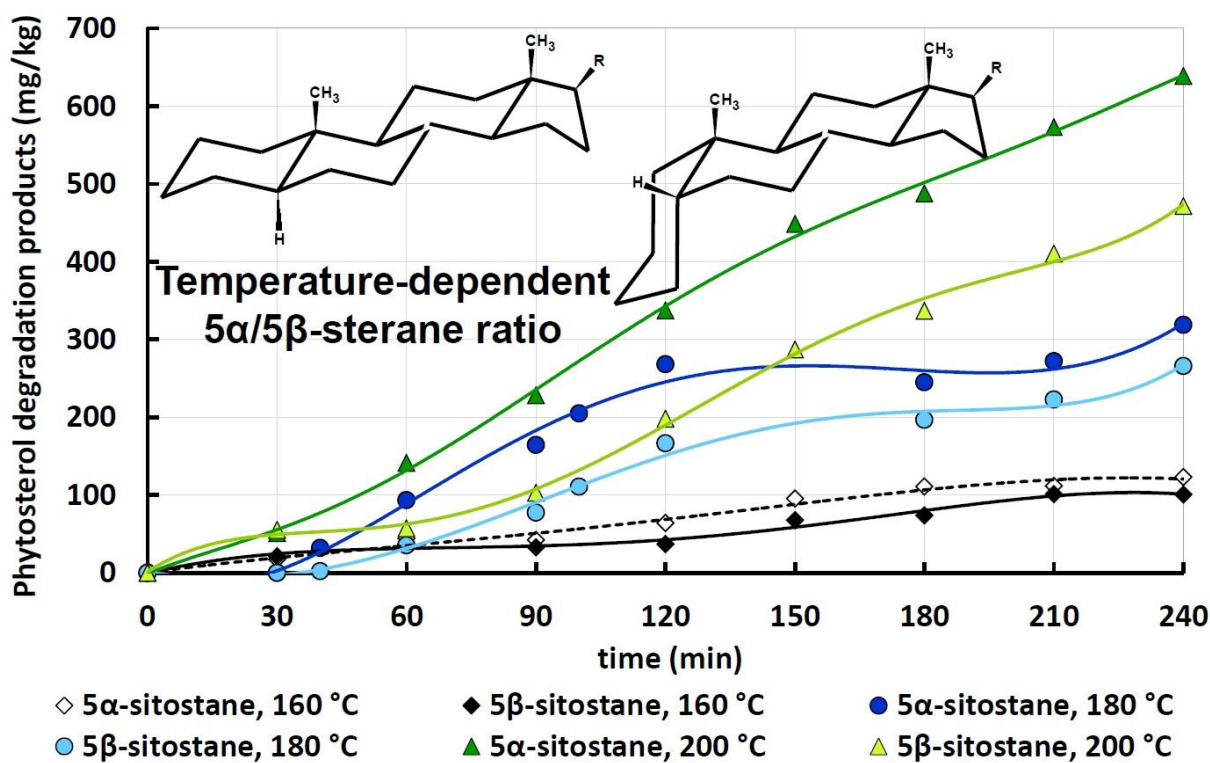
**Obr. 32** Mechanismus vzniku oxostanonů potvrzený deuteriačním experimentem.

V závěrečné fázi byl studován vznik degradačních produktů fytosterolů v laboratorních podmínkách. Během hydrogenačních procesů byly hydrogenovány fytosteroly řepkového a palmového oleje za vzniku příslušných fytosterolů pouze částečně. Konkurenčními reakcemi docházelo k migraci dvojné vazby z polohy C5 do polohy C3 a vzniku karbonylové skupiny keto-enol tautomerií. Specifickými produkty reakčního sledu byl  $5\alpha$ -sitostan-3-on (obr. 33) a  $5\alpha$ -kampestan-3-on. Hydrogenolýzou hydroxylové skupiny v poloze C3 vznikaly degradační meziprodukty,  $\Delta^3, \Delta^5$ -stereny, které byly dále hydrogenovány

na konečné produkty –  $5\alpha/5\beta$ -stigmastan a  $5\alpha/5\beta$ -kampestan. Pozorovány byly obě dvě stereoizomerní varianty, přičemž  $5\alpha$  forma byla dominantní (obr. 34)<sup>54</sup>.



Obr. 33 Vznik degradačních produktů fytosterolů při hydrogenaci řepkového oleje (180 °C).



Obr. 34 Teplotně podmíněný vznik derivátů sitostanu při hydrogenaci jedlých olejů<sup>54</sup>.

### **3. BUDOUCNOST      RAFINACE      A      MODIFIKACE ROSTLINNÝCH OLEJŮ**

Podle Organizace OSN pro výživu a zemědělství – FAO (Food and Agriculture Organization) poroste i nadále světová populace, současně se předpokládá vzestup životní úrovně v rozvojových zemích a logicky i nárůst spotřeby materiálů, energií a zejména potravin. Růst poptávky bude strmější než populační křivka a téma udržitelné zemědělské produkce, ekonomického rozvoje a společenského pokroku bude velmi aktuální. Z tohoto důvodu se pozice palmového oleje a jeho frakcí ještě více upevní, neboť má nejvyšší hektarový výnos, nízkou cenu a uplatnění napříč celým spektrem potravinářských výrobků. Současné snahy o náhradu palmového oleje, palmstearinu či palmoleinu nebo reformulace potravin s palmovým olejem nejsou příliš úspěšné. I přesto mohou nalézt alternativní řešení uplatnění v jiných odvětvích, příkladem je využití řady olejů získaných z jednobuněčných organismů v oleochemii či doplňcích stravy. Moderní technologický pokrok je motivován zejména kvalitou finálního produktu, který bude prostý cizorodých látek a procesních kontaminantů. Většina výrobců jedlých olejů a tukových výrobků nahradila v roce 2006 technologii parciální katalytické hydrogenace alkalickou transesterifikací a frakcionací. Prozatím. Osobně očekávám, že se více uplatní specifické i nespecifické enzymové modifikace olejů. Aktuální stav poznání nepřinesl uspokojivé odpovědi na řadu otázek, doposud víme jen málo o původu procesních kontaminantů či mechanismu jejich vzniku. Předpokládám, že aplikovaný výzkum bude i nadále zaměřen na bezpečnost potravin, současně dostanou prostor technologické inovace, jako jsou kontinuální hydrodynamické kavitační reaktory se sníženými nároky na prostor a obsluhu.

## 4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Filip V., Berčíková M., **Kyselka J.**: Potenciál palmového oleje v potravinářství. 54. Mezinárodní konference o olejích a tucích, 40 - 52, ISBN 978-80-86238-35-7, OSTDKCH Čs. spol. chem., Blansko 11 - 13.5.2016.
2. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service (USDA). <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery> (staženo 14. 10. 2020).
3. **Kyselka J.**, Kreps F., Skalka V., Mátlová V., Pustelníková L., Koláček J., Štětina J., Schmidt Š., Filip V.: About the origin of asclepic acid derived from crude homo- and heterolipids during successive solvent extraction of rapeseeds. *European Food Research and Technology*, 240, 477 - 487 (2015).
4. **Kyselka J.**, Kreps F., Mátlová V., Pustelníková L., Ulbrich P., Štětina J., Schmidt Š., Filip V.: The effect of rapeseed microstructure on the mechanism of solution and diffusion extraction. *European Food Research and Technology*, 240, 853 - 863 (2015).
5. Kreps F., **Kyselka J.**, Burčová Z., Schmidt Š., Rajchl A., Filip V., Ház A., Jablonský M., Sládková A., Šurina I.: Influence of deodorization temperature on formation of tocopherol esters and fatty acids polymers in vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 1600027 (2017).
6. Kreps F., **Kyselka J.**, Burčová Z., Schmidt Š., Filip V., Dubaj T., Gajdoš P., Čertík M.: Synthesis and analysis of tocopheryl quinone and tocopherol esters with fatty acids in heated sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 788 - 802 (2016).
7. Filip V.: Technologie olejů, tuků, detergentů a kosmetiky. V knize: Co byste měli vědět o výrobě potravin? *Technologie potravin* (Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., ed.), kap. 5, str. 295-316, KEY Publishing s.r.o., Praha 2009.
8. Yin H., Xu L., Porter N.A.: Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111, 5944 - 5972 (2011).
9. Velíšek J.: Fats, oils and other lipids. V knize: *The Chemistry of Food*, 2<sup>nd</sup> edition (Velíšek J., Koplík R., Cejpek K. ed.), kap. 3, str. 87 - 197, Wiley-Blackwell, 2020.
10. Buettner G.R.: The pecking order of the radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (2), 535 - 543 (1993).
11. Blanksby S.J., Ellison G.B.: Bond Dissociation Energies of Organic Molecules. *Accounts of Chemical Research*, 36 (4), 255 - 263 (2003).
12. Koppenol W.H.: Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS*, 264 (2), 165 - 167 (1990).
13. Atkins P., de Paula J.: *Fyzikální chemie*, 1st ed. (český překlad 9. vydání), kap. 6, str. 194 - 220, VŠCHT Praha, Praha 2013.
14. Schmidt Š.: Antioxidanty a oxidačné zmeny tukov v potravinách., kap. 2, str. 4 - 25, Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava 2010.
15. Filip V., **Kyselka J.**, Hrádková I., Berčíková M., Cihelková K.: A versatile apparatus for the bench scale bleaching and deodorisation of vegetable oils. *Czech Journal of Food Sciences*, 33 (6), 537 - 544 (2011).
16. Šmidrkal J., Filip V., **Kyselka J.**, Hrádková I.: Bělený olej. 27532 (číslo dokumentu), U1 (typ dokumentu), datum přijetí: 27.11.2014.
17. LoPachin R.M., Gavin T.: Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective. *Chemical Research in Toxicology*, 27, 1081 - 1091 (2014).
18. **Kyselka J.**, Cihelková K., Lopes-Lutz D., Chudoba J., Váchalová T., Alishevich K., Hrádková I., Berčíková M., Mikolášková M., Filip V.: Mechanism controlling high-

- temperature degradation of sunflower oil triacylglycerols in the absence of oxygen. *European Journal of Lipid Science*, 123, 2000228 (2020).
19. Váchalová T.: Využití kavitačních jevů a nanotechnologií v chemii a technologii tuků. Diplomová práce, Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT, Praha, 2020 (vedoucí DP: **Jan Kyselka**).
  20. Krchov R., Marek M., Pudil F., **Kyselka J.**, Marek A., Vrba P.: Způsob extrakce a purifikace biologicky cenných látek a příprava potravin a potravinových doplňků pomocí hydrodynamické kavitace. 2017-488 (číslo dokumentu), A3 (typ dokumentu), datum přijetí: 30.1.2019.
  21. Byers J.: Isolation and Identification of the Polyenes Formed During the Thermal Degradation of  $\beta,\beta$ -Carotene. *Journal of Organic Chemistry*, 48, 1515 – 1522 (1983).
  22. Chatgililoglu C., Ferreri C., Melchiorre M., Sansone A., Torreggiani A.: Lipid geometrical isomerism: from chemistry to biology and diagnostics. *Chemical Reviews*, 114, 255 – 284 (2014).
  23. Berčíková M., Šimková A., Hudecová K., **Kyselka J.**, Filip V., Hrádková I.: Physical properties of structured fats and fat blends based on the long chain fatty acids. *Food Biophysics*, 15, 143 – 152 (2020).
  24. Cihelková K., Schieber A., Lopes-Lutz D., Hradková I., **Kyselka J.**, Filip V.: Quantitative and qualitative analysis of high molecular compounds in vegetable oils formed under high temperatures in the absence of oxygen. *European Food Research and Technology*, 237, 71 – 81 (2013).
  25. Smith B.M., March J.: *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure (sixth edition)*. Kap 15, podkapitola 15.60, str. 1194 – 1215, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
  26. Carey F.A., Sundberg R.J.: *Advanced Organic Chemistry (Fourth edition), Part A: Structure and mechanisms*, kap. 1, str. 1 – 73, Springer Science + Business Media, Inc., 233 Spring Street, New York, NY, 10013 USA, 2001.
  27. **Kyselka J.**, Thomes L., Remišová S., Dragoun M., Berčíková M., Filip V.: Preparation of conjugated linoleic acid enriched derivatives by conventional and biphasic isomerisation. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(6), 511 – 521 (2016).
  28. Housecroft C.E., Sharpe A.G.: *Anorganická chemie*, 1<sup>st</sup> ed. (český překlad 4. vydání), kap. 8, str. 234 – 245, VŠCHT Praha, Praha 2014.
  29. DeGreyt W.F., Kellens M.J., Huyghebaert A.D.: Polymeric and oxidized triglyceride content of crude and refined vegetable oils - An overview. *Lipid/Fett*, 99, 287-290 (1997).
  30. Roca M.J., Andreo-Martínez P., García-Martínez N., Almela L.: Applicability of the EN 1785 Method for Detection of Paprika Irradiated with E-Beam. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122, 2000211 (2020).
  31. Zelinková Z., Švejkovská B., Velíšek J., Doležal M.: Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290 - 1298 (2006).
  32. Weißhaar R., Perz R.: Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 158 - 165 (2010).
  33. Šmidrkal J., Ilko V., Filip V., Doležal M., Zelinková Z., **Kyselka J.**, Hrádková I., Velíšek J.: Formation of acylglycerol chloro derivatives in vegetable oils and mitigation strategy. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 448-456 (2011).
  34. **Kyselka J.**, Matějková K., Šmidrkal J., Berčíková M., Pešek E., Bjelková B., Ilko V., Doležal M., Filip V.: Elimination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl esters during palm oil hydrogenation and wet fractionation. *European Food Research and Technology*, 244(11), 1887 – 1895 (2018).

35. Velíšek J., Davídek J., Kubelka V., Janíček G., Svobodová Z., Šimicová Z.: New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 1142–1144 (1980).
36. Ermacora A., Hrnčířík K.: Influence of oil composition on the formation of fatty acid esters of 2-chloropropane-1,3-diol (2-MCPD) and 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) under conditions simulating oil refining. *Food Chemistry*, 161, 383 – 389 (2014).
37. Zulkurnain M., Lai O.M., Latip R.A., Nehdi I.A., Ling T.C., Tan C.P.: The effects of physical refining on the formation of 3-monochloropropane-1,2-diol esters in relation to palm oil minor components. *Food Chemistry*, 135(2), 799 – 805 (2012).
38. Freudenstein A., Weking J., Matthäus B.: Influence of precursors on the formation of 3-MCPD and glycidyl esters in a model oil under simulated deodorization conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 286 - 294 (2013).
39. Tivanello R., Capristo M., Vicente E., Ferrari R., Sampaio K., Ariseto A.: Effects of deodorization temperature and time on the formation of 3-MCPD, 2-MCPD, and glycidyl esters and physicochemical changes of palm oil. *Journal of Food Science*, 85, 2255 - 2260 (2020).
40. Pudiel F., Benecke P., Fehling P., Freudenstein A., Matthäus B., Schwaf A.: On the necessity of edible oil refining and possible sources of 3-MCPD and glycidyl esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 368 - 373 (2011).
41. Cheng W., Liu G., Liu X.: Formation of Glycidyl Fatty Acid Esters Both in Real Edible Oils during Laboratory-Scale Refining and in Chemical Model during High Temperature Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 5919 - 5927 (2016).
42. Cichelli A., Riciputi Y., Cerretani L., Caboni M.F., d'Alessandro N.: Glycidols Esters, 2-Chloropropane-1,3-Diols, and 3-Chloropropane-1,2-Diols Contents in Real Olive Oil Samples and their Relation with Diacylglycerols. *Journal of American Oil Chemists Society*, 97, 15 - 23 (2020).
43. Šmidrkal J., Velíšek J., Filip V., Zelinková Z., Doležal M., **Kyselka J.**, Hrádková I.: Způsob zabránění vzniku acylderivátů monochlorpropandiolu při vysokoteplotních úpravách olejů a tuků. CZ 303281 B6, 11. 7. 2012.
44. Kyselka J., Šmidrkal J., Filip V., Pešek E., Berčíková M., Doležal M., Matějková K.: Způsob odstranění acylderivátů monochlorpropandiolu a glycidolu z plně ztužených tuků určených pro potravinářské účely. CZ 307495, 5. 9. 2018.
45. Ingold K.U., Pratt D.A.: Advances in Radical-Trapping Antioxidant Chemistry. In the 21<sup>st</sup> Century: A Kinetics and Mechanisms Perspective. *Chemical Reviews*, 114, 9022 – 9046 (2014).
46. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P.: *Food chemistry* (3rd revised edition), str. 212 – 218, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2005.
47. Appelqvist L.-A., Kamal-Eldin A.: The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids*, 31, 671 – 701 (1996).
48. Jirásková T.: Degradace doprovodných látek lipidů při zpracování palmového oleje. Diplomová práce, Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT, Praha, 2020 (vedoucí DP: **Jan Kyselka**).
49. Čmolík J., Pokorný J., Réblová Z., Svoboda Z.: Tocopherol retention in physically refined rapeseed oil as a function of deodorization temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 754-759, (2008).
50. Azadmard-Damirchi, S.; Dutta, P.C. Stability of minor lipid components with emphasis on phytosterols during chemical interesterification of a blend of refined olive oil and palm stearin. *Journal of American Oil Chemists Society*, 85, 13 - 21 (2008).

51. Verleyen, T.; Sosinska, U.; Ioannidou, S.; Verhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; De Greyt, W. Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols. *Journal of American Oil Chemists Society* 79, 947 - 953 (2002).
52. Verleyen, T.; Cortes, E.; Verhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; De Greyt, W. Factors determining the steradiene formation in bleaching and deodorisation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 331 - 339 (2002).
53. Bortolomeazzi, R.; De Zan, M.; Pizzale, L.; Conte L.S. Identification of new steroidal hydrocarbons in refined oils and the role of hydroxy sterols as possible precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1101 – 1105 (2000).
54. **Kyselka J.**, Honzíková T., Váchalová T., Jirásková T., Alishevich K., Rottnerová Z., Brychová V., Berčíková M., Hrádková I., Filip V.: Formation of 5 $\alpha$ -Sitostan-3-one, 5 $\alpha$ -Campestan-3-one, and steroidal hydrocarbons in edible oils during catalytic hydrogenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(35), 9916 – 9925 (2019).

## 5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                            |                                                                 |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| AL                         | Alfa Laval                                                      |
| BDE                        | Bond dissociation energy                                        |
| BHT                        | 3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluen                      |
| [Bmim].[NTf <sub>2</sub> ] | 1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imid    |
| DAG                        | Diacylglycerol                                                  |
| DCC                        | <i>N,N'</i> -Dicyklohexylkarbodiimid                            |
| DMAP                       | 4-Dimethylaminopyridin                                          |
| EFSA                       | European Food Safety Authority                                  |
| FDA                        | Food and Drug Administration                                    |
| GC/FID                     | Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem        |
| GC/MS                      | Plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem |
| GRAS                       | Generally Recognized as Safe                                    |
| HDL                        | High density lipoproteins                                       |
| HOMO                       | Highest occupied molecular orbital                              |
| IL                         | Ionic liquid / iontová kapalina                                 |
| IP                         | Indukční perioda                                                |
| LDL                        | Low density lipoproteins                                        |
| LUMO                       | Lowest unoccupied molecular orbital                             |
| MAG                        | Monoacylglycerol                                                |
| MCPD                       | Monochlorpropandiol                                             |
| PPh <sub>3</sub>           | Trifenylfosfin                                                  |
| TAG                        | Triacylglycerol                                                 |
| TLC-FID                    | Tenkovrstvá chromatografie s plamenově ionizačním detektorem    |
| vMK                        | Volné mastné kyseliny                                           |

## 6. PŘÍLOHY

1. **Kyselka J.**, Cihelková K., Lopes-Lutz D., Chudoba J., Váchalová T., Alishevich K., Hrádková I., Berčíková M., Mikolášková M., Filip V.: Mechanism controlling high-temperature degradation of sunflower oil triacylglycerols in the absence of oxygen. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000228, 2020. IF 2,056.
2. Berčíková M., Šimková A., Hudecová K., **Kyselka J.**, Filip V., Hrádková I.: Physical properties of structured fats and fat blends based on the long chain fatty acids. *Food Biophysics* 15(7): 143-152, 2020. IF 2,387.
3. **Kyselka J.**, Honzíková T., Váchalová T., Jirásková T., Alishevich K., Rottnerová Z., Brychová V., Berčíková M., Hrádková I., Filip V.: Formation of 5 $\alpha$ -Sitostan-3-one, 5 $\alpha$ -Campestan-3-one, and steroidal hydrocarbons in edible oils during catalytic hydrogenation. *J. Agric. Food Chem.* 67(35):9916-9925, 2019. IF 4,192.
4. **Kyselka J.**, Matějková K., Šmidrkal J., Berčíková M., Pešek E., Bjelková B., Ilko V., Doležal M., Filip V.: Elimination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl esters during palm oil hydrogenation and wet fractionation. *Eur. Food Res. Technol.* 244(11):1887-1895, 2018. IF 2,366.
5. **Kyselka J.**, Bleha R., Dragoun M., Bialasová K., Horáčková Š., Schätz M., Sluková M., Filip V., Synytsya A.: Antifungal polyamides of hydroxycinnamic acids from sunflower bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* 66(42):11018-11026, 2018. IF 4,192.
6. Kreps F., **Kyselka J.**, Burčová Z., Schmidt Š., Rajchl A., Filip V., Ház A., Jablonský M., Sládková A., Šurina I.: Influence of deodorization temperature on formation of tocopherol esters and fatty acids polymers in vegetable oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119(3):16-27, 2017. IF 2,056.
7. Kreps F., **Kyselka J.**, Burčová Z., Schmidt Š., Filip V., Dubaj T., Gajdoš P., Čertík M.: Synthesis and analysis of tocopheryl quinone and tocopherol esters with fatty acids in heated sunflower oil. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* 118:788-802, 2016. IF 2,056.
8. **Kyselka J.**, Thomes L., Remišová S., Dragoun M., Berčíková M., Filip V.: Preparation of conjugated linoleic acid enriched derivatives by conventional and biphasic isomerisation. *Czech J. Food Sci.* 34:511-521, 2016. IF 0,932.
9. **Kyselka J.**, Kreps F., Mátlová V., Pustelníková L., Ulbrich P., Štětina J., Schmidt Š., Filip V.: The effect of rapeseed microstructure on the mechanism of solution and diffusion extraction. *Eur. Food Res. Technol.* 240:853-863, 2015. IF 2,366.
10. **Kyselka J.**, Kreps F., Skalka V., Mátlová V., Pustelníková L., Koláček J., Štětina J., Schmidt Š., Filip V.: About the origin of asclepic acid derived from crude homo- and heterolipids during successive solvent extraction of rapeseeds. *Eur. Food Res. Technol.* 240:477-487, 2015. IF 2,366.
11. Cihelková K., Schieber. A., Lopes-Lutz D., Hradkova I., **Kyselka J.**, Filip V.: Quantitative and qualitative analysis of high molecular compounds in vegetable oils formed under high temperatures in the absence of oxygen. *Eur. Food Res. Technol.* 237:71-81, 2013. IF 2,366.
12. Hrádková I., Merkl R., Šmidrkal J., **Kyselka J.**, Filip V.: Antioxidant effect of mono- and dihydroxyphenols in sunflower oil with different levels of naturally present tocopherols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115:747-755, 2013. IF 2,056.
13. Šmidrkal J., Ilko V., Filip V., Doležal M., Zelinková Z., **Kyselka J.**, Hrádková I., Velišek J.: Formation of acylglycerol chloro derivatives in vegetable oils and mitigation strategy. *Czech J. Food Sci.* 29:448-456, 2011. IF 0,932.